

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
"Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського"

Кваліфікаційна наукова
робота на правах рукопису

ЕРДЕНЕЦОГТ УЛЗІЙЖАРГАЛ

УДК 579.852.11+579.841.2+579.22+547.56+633.16+631.8

ДИСЕРТАЦІЯ
БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИКОРИСТАННЯ НАНОКОМПОЗИТНОГО
БАКТЕРІАЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ АЗОГРАН І ЙОГО ПРОТЕКТОРНА
РОЛЬ У АГРОЕКОСИСТЕМІ ЯЧМЕНЮ

162 – біотехнології та біоінженерія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ Улзійжаргал Е.

Науковий керівник: д.б.н., професор, Горго Ю. П.

Науковий консультант: к.б.н. Скороход І. О.

Київ – 2020

АНОТАЦІЯ

Ерденецогт *Улзійжаргал*. Біотехнологія використання
нанокомпозитного бактеріального препарату Азогран і його протекторна
роль в агроєкосистемі ячменю. – Кваліфікаційна наукова робота на правах
рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі
знань 16 Хімічна та Біоінженерія за спеціальністю 162 Біотехнологія та
біоінженерія. – Національний технічний університет України "Київський
Політехнічний Інститут імені Ігоря Сікорського", Київ, 2020.

У дисертаційній роботі розглянуто актуальне питання про використання
біопрепаратів, які допомагають підвищенню стійкості рослин ячменю до дії
стрес-факторів середовища, поліпшення врожайності і якості насіння
культури в різних кліматичних зонах вирощування. Перевірялася
ефективність впливу нанокомпозитного комплексного бактеріального
препарату Азогран на ріст і розвиток рослин ячменю різних сортів, що
вирощуються в Україні, Монголії та Канаді. Експериментальна частина
роботи виконувалася у відділі мікробіологічних процесів на твердих
поверхнях Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН
України.

Проводилось дослідження впливу бактеризації стресованного насіння
ячменю нанокомпозитним комплексним бактеріальним препаратом Азогран
на ріст і розвиток ячменю. Компонентами препарату є штами *Azotobacter*
vinelandii IMB B-7076 і *Bacillus subtilis* IMB B-7023, а також
наноструктурований глинистий мінерал бентоніт. У дослідженнях
використовували насіння ярого ячменю сортів Бурхант (Монголія), Віраж
(Україна) і Копленд (Канада). Застосовували 2 варіанти обробки посівного
матеріалу з використанням : 33% H₂O₂ і 33% H₂O₂+Азогран.

Вперше показана ефективна протекторна роль нанокомпозитного
комплексного бактеріального препарату Азогран при обробці насіння

досліджуваної злакової культури стрес-агентом – пероксидом водню. Показано, що ефективність впливу бентоніту на антиоксидантні та антирадикальні властивості метаболітних комплексів *Azotobacter vinelandii* і *Bacillus subtilis* була концентраційно залежною. Відповідно за культивування досліджуваних штамів бактерій з 0,05 – 0,1 г/л глинистого мінералу антиоксидантний потенціал їх метаболітних комплексів зростає, а при більш високих його концентраціях в живильному середовищі – знижувався.

За допомогою квантово-хімічної програми Gaussian 09W отримані нові розрахунки термодинамічних показників механізмів інактивації агресивних стрес-агентів для 2,3-дигідрокси-6-метил-(4H)-піран-4-ону (DDMP) метаболіту *Bacillus subtilis* IMB B-7023. Встановлено, що дана сполука дезактивує активні форми кисню за механізмами одноелектронного перенесення (SET) і електронно-донорного, що супроводжується відщеплення протона (SET-PT).

Вперше встановлено, що обробка посівного матеріалу досліджуваних 3-х сортів ячменю, пероксидом водню і препаратом Азогран істотно впливала на якісний і кількісний склад фенолкарбонових кислот і флавоноїдів в рослинах цієї злакової культури.

В роботі показано, що ефективна протекторна роль нанокompозитного комплексного бактеріального препарату Азогран в агроєкосистемі ячменю корелює з раніше встановленим стимулюючим ефектом біопрепарату на ріст і розвиток інших злаків. Це вказує на перспективність використання Азограну на інші перспективні об'єкти рослинництва в умовах оксидативного стресу.

Результати дисертаційної роботи використовуються в навчальному процесі кафедри біоінформатики факультету біотехнології і біотехніки Національного технічного університету України "КПІ ім. Ігоря Сікорського" при розробці лекцій і практичних занять.

Проведений аналіз даних показав, що при пост-обробці стресованного посівного матеріалу ячменю препаратом Азогран відбувається приріст по

висоті рослин для всіх сортів ячменю у фазах виходу в трубку та “цвітіння – воскова стиглість” в порівнянні з варіантом, де рослини розвивалися з насіння, обробленого тільки пероксидом водню. В роботі була встановлена також залежність інгібуючого впливу пероксиду водню на схожість насіння різних сортів ячменю від концентрації стрес-агента.

Показано, що пост-обробка посівного матеріалу наноккомпозитним бактеріальним препаратом Азогран проявляла антиоксидантну дію на ріст рослин в різних фазах розвитку.

Ключові слова: препарат Азогран, наночастки бентоніту, пероксидний стрес, антиоксидантні і антирадикальні властивості, бактеризація насіння, ярий ячмінь, фенолкарбонові кислоти і флавоноїди.

SUMMARY

Ulziijargal Erdenetsogt. Biotechnology of using the nanocomposite bacterial preparation Azogran and its protective role in the agroecosystem of barley. – Qualification of scientific work as a manuscript.

Thesis for the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 162 Biotechnology and Bioengineering (Field of study 16 Chemical and Bioengineering). – National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv, 2020.

In this dissertation work, the topical issue of the use of biological products, that help increase the resistance of barley plants to the action of environmental stress factors, improve the yield and quality of barley in different climatic zones of cultivation is considered. The growth and development efficiency of the nanocomposite complex derived from bacterial preparation Azogran was tested on various barley plants grown in Ukraine, Mongolia, and Canada. The experimental part of the work was carried out in the department of microbiological processes on

solid surfaces of the Institute of Microbiology and Virology named after D.K. Zabolotny National Academy of Sciences of Ukraine.

The effect of bacterization of barley seeds using the bacterial preparation Azogran on their growth was inspected under peroxide stress. The components of the preparation are the strains *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076 and *Bacillus subtilis* IMV B-7023, as well as bentonite nanoparticles. Seeds of bright barley varieties Burkhan (Mongolia), Virazh (Ukraine), and Copeland (Canada) were used in this work. Two variants were used for the treatment of seeds, including 33% H₂O₂ and 33% H₂O₂+Azogran solutions.

For the first time, the effective protective role of the nanocomposite complex bacterial preparation Azogran in the form of an antioxidant effect on seeds of different varieties of barley, when treated with a stress-agent – hydrogen peroxide, is shown. It was noted that the effectiveness of bentonite on the antioxidant and antiradical properties of the metabolic complexes of *Azotobacter vinelandii* and *Bacillus subtilis* are determined by the concentration of this mineral in the nutrient medium. At concentrations of bentonite (0.05 – 0.1 g/L), the antioxidant potential of the metabolite complexes increased, and at higher concentrations of this nanostructured mineral in the nutrient medium, the antioxidant status of bacterial components of Azogran decreased.

Using the Gaussian 09W quantum chemical program, new calculations of the thermodynamic parameters of the mechanisms of inactivation aggressive stress agents for 2,3-dihydroxy-6-methyl-(4H)-pyran-4-one (DDMP) metabolite *Bacillus subtilis* IMV B-7023 were obtained. It has been obtained and established that during inactivation, a single-electron transfer mechanism (SET) and electron donor mechanism accompanied by proton elimination (SET-PT).

It was found, for the first time that the treatment of seed material of 3 varieties of barley obtained from different countries with hydrogen peroxide and Azogran preparation was significantly influenced the qualitative and quantitative composition of phenol carboxylic acids and flavonoids in plants of this cereal culture.

The effective protective role of the nanocomposite complex bacterial preparation Azogran in the agroecosystem of barley correlates with the previously established stimulating effect of the biological product on the growth and development of other cereals. This indicates the potential and promising use of the antioxidant effect of Azogran on other objects of crop production.

The results of the dissertation work are used in the educational process of the Department of Bioinformatics of the Faculty of Biotechnology and Biotechnics of the National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky KPI" in the development of lectures and practical lessons.

The analysis of the data showed that when the seeds were treated with hydrogen peroxide and Azogran, there was an increase in height for all varieties of barley in the phase of entering the tube in comparison with the variant where the plants developed from seeds treated with only hydrogen peroxide.

All varieties of barley in the “flowering – waxy ripeness” phase retained the differences in the height of barley plants with variable treatments of the seed material. The work also established the dependence of the inhibitory effect of hydrogen peroxide on the germination of seeds of different varieties of barley on the concentration of the stress factor. It was also shown that post-treatment of the inoculum with the nanocomposite bacterial preparation Azogran exhibited an antioxidant effect on plant growth in different phases of development.

The work shows the effective protective role of the nanocomposite complex bacterial preparation Azogran in the agroecosystem of different varieties of barley.

Keywords: Azogran preparation, bentonite nanoparticles, peroxide stress, antioxidant and antiradical properties, seed bacterization, spring barley, phenolic carboxylic acids, flavonoids.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Статті у наукових фахових виданнях України та виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних

1. Iryna Skorochoch, Alla Roy, Ivan Kurdish, **Ulziijargal Erdenetsogt**. Content of organic acids in the cultural medium of *Bacillus subtilis* IMV B-7023 at cultivation with different sources of the phosphorus nutrient // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2020; №.10(1), p.73-77. ISSN: 1338:5178.
2. **E. Ulziijargal**, I.O. Skorochoch, I.K. Kurdish, A.A. Roy, Yu.P. Gorgo. Antioxidant action of a nanocomposite biological product Azogran on seeds development of different varieties of barley // International Journal of Scientific and Research Publications. 2020; №.10(4), p.154-158. ISSN: 2250:3153.
3. Skorochoch I.A, **Ulziijargal E.**, Kurdish I.K, Gorgo Yu.P. Influence of a nanocomposite biological product of Azogran on barley seeds exposed to oxidative stress // Scientific Light. 2020; №.1(36), p.10-14. ISSN: 1338:5178.
4. **Ulziijargal Erdenetsogt**, Yu.P. Gorgo, I.O. Skorochoch. Detection of Seedborne Mycoflora in Wheat // International Journal of Innovative Science and Research Technology - IJISRT. 2019; №.4(10), p.532-536. ISSN: 2456:2165.

Публікації, які вказують на апробацію матеріалів дисертації

5. **Ulziijargal E**, Gorgo Yu.P, Skorochoch I.O, Kurdish I.K. Bacterial preparation for agricultural use // Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», Київ. 2020; с.86
6. **Улзійжаргал Ерденецогт**, Скороход І.О, Курдиш І.К, Горго Ю.П. Антиоксидантна дія біопрепарата Азогран на насіння ячменю //

Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», Київ. 2020; с.87

7. **Ulziijargal Erdenetsogt**, Skorochod I.O, Kurdish I.K, Gorgo Yu.P. Barley production and consumption // Natural Sciences: History, The present time, The future, EU experience—International Scientific and Practical Conference, Republic of Poland. 2019; p.27-30.
8. **Ulziijargal Erdenetsogt**, Skorochod I.O, Kurdish I.K, Gorgo Yu.P. Genetic mapping of barley genes // Матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», Київ. 2019; с.78
9. **Ulziijargal Erdenetsogt**, Skorochod I.O, Kurdish I.K, Gorgo Yu.P. The role of phenolic compounds in the formation of barley antioxidant potential // Матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», Київ. 2019; с.79
10. **Ulziijargal E.**, Gorgo Yu.P, Tuvshinjargal G. Screening of fungi from wheat seeds // International Conference on Problems and Prospects of Public Health, dedicated to the 85th anniversary of the establishment of the National Public Health Center of Mongolia, Ulaanbaatar. 2018; p.100-101
11. **Улзійжаргал Ерденецогт**, Горго Ю.П. Особливості роботи імунної системи лікарських рослин // Матеріали XIII Міжнародної конференції по прикладній біофізиці, біоніці та біокібернетиці. Київ. 2018; с.24

ЗМІСТ

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ	11
ВСТУП	12
РОЗДІЛ 1. ПРОТЕКТОРНА РОЛЬ БІОПРЕПАРАТІВ У ЗАХИСТІ ЯЧМЕНЮ ВІД ДІЇ СТРЕС-АГЕНТІВ	19
1.1. Ячмінь і перспективи його використання в різних сферах промисловості	19
1.1.1. Характеристики ячменю	20
1.1.2. Життєвий цикл розвитку ячменю	21
1.1.3. Антиоксидантний комплекс рослин ячменю	23
1.1.4. Сенсibilізація рослин ячменю до різних стрес-факторів	25
1.2. Використання біологічних препаратів в технології аграрного виробництва ячменю	27
1.2.1. Класифікація сучасних засобів захисту рослин	27
1.2.2. Характеристики біопрепаратів, які використовують в агроєкосистемі ячменю для зниження негативного впливу стрес-факторів	31
1.2.3. Механізми дії біопрепаратів, створених на основі стимулюючих ріст рослин мікроорганізмів	33
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	37
2.1. Об'єкти досліджень	37
2.2. Умови культивування мікроорганізмів	37
2.3. Оцінка антиоксидантних властивостей культуральних середовищ (метаболітних комплексів) <i>Azotobacter vinelandii</i> IMB B-7076 і <i>Bacillus subtilis</i> IMB B-7023	39
2.4. Квантово-хімічні розрахунки термодинамічних показників антиоксидантних механізмів для 2,3-дигідрокси-6-метил (4H)-піран-4- ону (DDMP) - метаболіту <i>Bacillus subtilis</i> IMB B-7023	42
2.5. Дослідження антиоксидантної дії нанокomпозитного комплексного бактеріального препарату Азогран на насіння різних сортів ярового ячменю	43

2.6. Метод отримання метанольних екстрактів рослин різних сортів ячменю	45
2.7. Метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) фенолкарбонових кислот в метанольних екстрактах рослин різних сортів ячменю	46
2.8. Високоефективна рідинна хроматографія флавоноїдів в метанольних екстрактах рослин різних сортів ячменю	47
2.9. Статистична обробка результатів	47
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	48
3.1. Вплив наноструктурованого мінералу бентоніт на антиоксидантні властивості <i>Azotobacter vinelandii</i> IMB B-7076 і <i>Bacillus subtilis</i> IMB B-7023	48
3.1.1. Залежність антиоксидантного потенціалу метаболітного комплексу <i>Azotobacter vinelandii</i> IMB B-7076 від вмісту бентоніту в живильному середовищі	49
3.1.2. Вплив різних концентрацій бентоніту на антиоксидантні властивості метаболітного комплексу <i>Bacillus subtilis</i> IMB B-7023	52
3.1.2.1. Дослідження антиоксидантних властивостей 2,3-дигідрокси-6-метил-(4Н)-піран-4-ону –унікального метаболіту <i>Bacillus subtilis</i> IMB B-7023	56
3.2. Антиоксидантний вплив нанокмпозитного комплексного бактеріального препарату Азогран на ріст і розвиток ячменю	62
3.3. Ефекти впливу абіотичного стрес-агенту і нанокмпозитного комплексного біопрепарату Азогран на вміст фенольних сполук у рослинах ячменю	68
3.4. Технологія підготовки препарату Азогран при його застосуванні в агроєкосистемі ячменю в умовах оксидативного стресу	86
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	90
ВИСНОВКИ	100
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	102
ДОДАТОК	136

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СКОРОЧЕНЬ

- ABTS^{•+} – 2, 2'-азино-біс (3-етілбензотіазолін-6-сульфо кислота)
 AIP – адіабатичний потенціал іонізації (Adiabatic Ionization Potential)
 An – антиоксиданти
 Ar (OH)_n або (Ph-OH) – сполуки фенольної природи
 APA – антирадикальна активність
 BDE – ентальпія дисоціації О-Н зв'язку (Bond Dissociation Enthalpy)
 BHT – бутильований гідрокситолуол
 CAT – каталаза
 DDMP – 2,3-дигідрокси-6-метил (4H)-піран-4-он
 DPPH – 2,2-діфеніл-1-пікрилгідрозил радикал
 GPX – глутатіонпероксидази
 GS – стадія росту (Growth Stage)
 H₂O₂ – пероксид водню
 HAT – перенесення атома водню (Hydrogen Atom Transfer)
 HOMO – верхня зайнята молекулярна орбіталь (Highest Occupied Molecular Orbital)
 •OH – гідроксильний радикал
¹O₂ – синглетний кисень
 ONOOH – пероксинітрит
 PDE – ентальпія дисоціації протона (Proton Dissociation Enthalpy)
 R• – вільні радикали
 ROO• – перекисний радикал
 ROS – активні форми кисню
 SET – механізм одноелектронного перенесення (Single Electron Transfer)
 SET-PT – електронно-донорний механізм, що супроводжується відщепленням H⁺ (Single-electron transfer followed by proton transfer)
 SOD – супероксиддисмутаза (superoxide dismutase)
 O₂^{•-} – супероксидний аніон- радикал
 АФК – активні форми кисню
 ВЕРХ – вискоєфективна рідинна хроматографія
 КА – картопляний агар
 КС – культуральне середовище (культуральна рідина, звільнена від клітин бактерій)
 КР – культуральна рідина (поживні середовища з бактеріями, в яких вони вирощені)
 ПОЛ – перекисне окислення ліпідів
 СХ – Азогран
 ХЗЗР – хімічних засобів захисту рослин

ВСТУП

Актуальність теми. У теперішній час ячмінь – четверта за значимістю зернова культура в світі, що вирощується в більш ніж 100 країнах [159, 308]. Провідними виробниками за кількістю продукції є Росія, Франція, Німеччина, Австралія та Україна [299]. Близько 94% світового виробництва ячменю в основному використовується для виробництва пива, згідно із "статистикою Євросоюду", і лише 2% використовується для інших сфер споживання людини [184, 228]. Існують численні позитивні характеристики ячменю, що робить цю культуру цікавою для її застосування в різних сферах людської діяльності.

Відомо, що ячмінь у вигляді різних продуктів, біодобавок і кормів позитивно впливає на здоров'я людини і тварин. Наприклад, високий вміст β -глюкана в зерні цього злаку знижує ризик розвитку серцево-судинних захворювань і рівень холестерину, що, відповідно, робить ячмінь цікавою культурою для дієтології. Біологічно активні сполуки цього злака мають і лікарське значення, вони впливають на метаболізм глюкози в організмі людини, знижуючи швидкість всмоктування вуглеводу в кров, стабілізуючи цим рівень цукру [101, 295, 86]. Крім того висіви шестирядного ячменю використовують в основному для випасу худоби [87, 189, 269].

У Монголії ячмінь є злаком, який має широке застосування. Особлива перспектива відводиться напрямку досліджень лікарських властивостей цієї культури. Уряд країни зацікавлений у розвитку технологій, які сприяють підвищенню урожайності ячменю і його захисту від стресових впливів в складних кліматичних умовах країни. Тут слід враховувати, що перед сучасною аграрною наукою стоїть завдання підвищення стійкості зернових культур до впливу абіотичних стресів (грунтова посуха, заморозки, засолення, ефекти важких металів, УФ-радіація, гербіциди та затоплення) [59, 65, 95]. В останні роки посилюється кліматична нестабільність, а ріст кількості погодних аномалій призводить до порушень метаболізму рослин і зниження їхньої

продуктивності [46]. Рослина може піддаватися стресу ще на початковому етапі онтогенезу, втрачати здатність до проростання на стадії насіння в результаті накопичення дегенеративних змін. Наслідки стресу можуть привести до дефіциту росту, врожаю, або взагалі до загибелі, якщо шкідлива дія стрес-агентів перевищить межі фітотолерантності [114, 210].

У зв'язку з цим, перспективним є дослідження щодо використання біологічних препаратів, які підвищують стійкість рослин до дії різних стрес-факторів середовища, покращують врожайність і якість посівного матеріалу. Суттєвий інтерес викликає наноконкомпозитний комплексний бактеріальний препарат Азогран (*Azotobacter vinelandii* IMB B-7076+ *Bacillus subtilis* IMB B-7023 + глинистий мінерал бентоніт), який покращує азотне і фосфорне живлення рослин, стимулює їх ріст і розвиток, підвищує урожайність, інгібує поширення в агроценозах ряду фітопатогенів та фітофагів [30]. Раніше встановлено, що Азогран ефективно впливає на ріст і розвиток газонних трав, багатьох видів декоративних рослин, сіянців і садженців сосни і ялини, збільшує кількість квітконосних пагонів на кущах троянд на 26 – 47%, підвищує врожайність томатів на 37%, ярого ячменю – на 18%, озимої пшениці – на 20% [79, 207].

Однак мало уваги приділялось вивченню антиоксидантного ефекту Азограну на перспективні сільськогосподарські культури в умовах оксидативного стресу. Відповідно актуальним було дослідження протекторної ролі даного наноконкомпозитного комплексного бактеріального препарату в агроєкосистемі ячменю, за обробки посівного матеріалу стрес-агентом – пероксидом водню. В подальшому це дозволить створити біотехнологію використання біопрепарату Азогран при вирощуванні досліджуваної злакової культури в складних кліматичних умовах.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася на кафедрі біоінформатики факультету біотехнології і біотехніки Національного технічного університету України (НТУУ) "КПІ ім. Ігоря Сікорського" і в відділі мікробіологічних процесів на

твердих поверхнях Інституту мікробіології і вірусології (ІМВ) ім. Д.К. Заболотного НАН України. Дослідження по визначенню характеристик антиоксидантного та лікувального потенціалу представників роду *Hordeum* в нормальних погодніх умовах і в стрес-умовах (підвищена температура, посушлива атмосфера та ін.) проводилися в рамках теми "Визначення впливу наднизькочастотних флуктуацій геомагнітного поля на характеристики води, люмінесцентні бактерії і волютинови гранули дріжджів" (за результатами конкурсу спільних українсько-словацьких дослідних проектів на 2017 – 2019 роки між Національною академією наук (НАН) України та Словацької академією наук (САН) від 20.03.2017). А також по темі "Вивчення біоіндикації геофізичних подій за участю мікроорганізмів" в рамках базового фундаментального дослідження ІМВ ім. Д.К. Заболотного "Фізіолого-біохімічні та молекулярно-генетичні особливості і механізми біологічної активності дріжджів, актино-бактерій і молочнокислих бактерій" (затверджена за результатами конкурсу спільних українсько-словацьких науково-дослідних проектів на 2020 – 2022 р. між НАН України та САН від 13.03.20). Дослідження по темі "Біотехнологія змін антиоксидантного та лікарського потенціалу представників роду *Hordeum* при впливі бактерій-компонентів препарату Азогран", проводилися в рамках "Угоди про наукове співробітництво між відділом мікробіологічних процесів на твердих поверхнях ІМВ ім. Д.К. Заболотного НАН України та кафедри біоінформатики ФБТ НТУУ «КПІ ім. Ігоря Сікорського» від 25.01.2019 р. Робота також проводилася як прикладний розвиток науково-дослідної теми відділу мікробіологічних процесів на твердих поверхнях ІМВ ім. Д.К. Заболотного НАН України "Наукові основи створення сипучого бактеріального препарату комплексної дії для злакових культур" (№ 0110U006112), яка виконувалася в 2010 – 2014 р.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягала у дослідженні антиоксидантних властивостей для використання нанокompозитного комплексного бактеріального препарату Азогран в агроєкосистемі ячменю за умов перекисного стресу.

Для реалізації поставленої мети основними завданнями роботи були:

1. Встановити вплив наноструктурованого мінералу бентоніту на антиоксидантний статус метаболітних комплексів *Bacillus subtilis* IMB B-7023 і *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076.
2. Дослідити антиоксидантний вплив нанокompозитного комплексного бактеріального препарату Азогран на насіння сортів ячменю з різних кліматичних зон за його обробки стрес-агентом – перексидом водню.
3. Провести порівняльний аналіз якісного і кількісного складу фенольних сполук в рослинах різних сортів ячменю при обробці їх насіння перексидом водню і нанокompозитним комплексним бактеріальним препаратом Азогран.
4. Розробити біотехнологічні основи використання Азограну для збільшення урожайності та стресостійкості сортів ячменю з різних кліматичних зон.

Об'єкт дослідження – форма нанокompозитного комплексного бактеріального препарат Азогран в складі *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076, *Bacillus subtilis* IMB B-7023 і бентоніту

Предмет дослідження – антиоксидантні властивості нанокompозитного комплексного бактеріального препарату Азогран і його роль в функціонуванні та захисту рослин ячменю при впливі стрес-агентів.

Методи дослідження – мікробіологічні, біохімічні, хіміко-аналітичні, хроматографічні, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше показано, що при концентрації бентоніту (0,05 – 0,1 г/л) антиоксидантний потенціал метаболітичних комплексів *Azotobacter vinelandii* і *Bacillus subtilis* був найбільшим, що є важливим для біотехнології використання компонентів Азограна при вирощуванні ячменю в різних кліматичних зонах.

Отримані нові значення термодинамічних показників механізмів інактивації агресивних стрес-агентів для 2,3-дигідрокси-6-метил-(4H)-піран-4-ону (DDMP) – метаболіту *Bacillus subtilis*, дозволили віднести DDMP до групи антиоксидантів середньої сили.

Вперше показана ефективна протекторна роль комплексного бактеріального препарату Азогран і його вплив на стресованих пероксидом водню насіння різних сортів ячменю.

Вперше встановлено, що пост-обробка препаратом Азогран посівного матеріалу 3-х сортів ячменю з України, Монголії та Канаді, стресованих пероксидом водню, істотно покращувала якісний і кількісний склад фенолкарбонових кислот і флавоноїдів в рослинах.

Практичне значення отриманих результатів. Технологія пост-обробки насіння ячменю комплексним біопрепаратом Азогран, з використання антиоксидантного потенціалу його бактерій-компонентів та бентоніту, сприяє збільшенню урожайності і поліпшенню розвитку сортів Віраж, Бурхант і Копленд з різних кліматичних зон.

Визначена ефективність антиоксидантної дії комплексного бактеріального препарату Азогран в агроєкосистемі ячменю вказує на перспективність використання протекторної ролі Азограна на покращання росту і розвитку інших рослин при дії стрес-факторів.

Результати дисертаційної роботи використовуються в навчальному процесі кафедри біоінформатики факультету біотехнології і біотехніки Національного технічного університету України "КПІ ім. Ігоря Сікорського" при розробці лекцій і практичних занять з дисципліни "Молекулярна Біофізика".

Особистий внесок здобувача. Експериментальна частина роботи виконана автором особисто у відділі мікробіологічних процесів на твердих поверхнях Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Всі дослідження проводилися при безпосередній участі дисертанта. Автором особисто проведені огляд і аналіз наукових джерел літератури за темою дисертації, визначені методи та проведені експериментальні дослідження і інтерпретація їх результатів, статистична обробка отриманих даних.

Дисертантом встановлено антиоксидантну дію нанокompозитного комплексного бактеріального препарату Азогран на насіння різних сортів ячменю при їх обробці пероксидом водню. Проведено аналіз морфометричних показників рослин ячменю в залежності від способу обробки посівного матеріалу. Зроблена пробопідготовка для аналізу метанольних екстрактів, отриманих з рослин ячменю, на вміст в них вільної та зв'язаної фракцій сполук фенольної природи.

Дослідження впливу різних концентрацій глинистого мінералу бентоніту на антиоксидантний потенціал метаболітних комплексів *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 і *Bacillus subtilis* IMB B-7023, а також розрахунок термодинамічних показників механізмів інактивації стрес-агентів для 2,3-дигідрокси-6-метил(4Н)-піран-4-ону за допомогою квантово-хімічної програми Gaussian 09W, проведені спільно з науковим співробітником відділу мікробіологічних процесів на твердих поверхнях IMB ім. Д.К. Заболотного НАН України к.б.н. Скороход І.О. Високоєфективна рідинна хроматографія проведена за участю с.н.с., к.б.н. Хархоти М.А. (Лабораторія біологічно полімерних з'єднань при ЦКІП НАН України).

Планування і обговорення основних напрямків роботи, формування положень і висновки дисертації були проведені з науковим керівником д.б.н., проф. Горго Ю.П. і співробітниками відділу мікробіологічних процесів на твердих поверхнях IMB НАН України, д.б.н., проф. Курдишем І.К. і к.б.н. Скороход І.О. Автор висловлює вдячність всім співробітникам відділу

мікробіологічних процесів на твердих поверхнях Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за допомоги в підготовці дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на звітних конференціях-конкурсах наукових робіт Національного технічного університету України "Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського (2018, 2019, 2020); на конференції «International Conference on Public health issues and perspectives dedicated to the 85th anniversary of the establishment of the National Center for public health of Mongolia» (Монголія, 2018); на XIII Міжнародній конференції по прикладній біофізиці, біоніці та біокібернетиці (Київ, 2018); на Міжнародній науково-практичній конференції з медичних, природничих і технічних наук «Natural Sciences: History, The Present time, The Future, EU Experience» (Республіка Польща, 2019); на XIII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття», присвяченій 185-річчю від дня народження Д.І. Менделєєва (Київ, 2019); на XIV Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття», присвяченій 135-річчю від дня народження О.В. Палладіна (Київ, 2020).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 11 наукових робіт, з них 4 статті у наукових фахових виданнях (Scopus, Pub Med, Web of Science, Index Copernicus, Crossref, Directory of open access journal) і спеціалізованих виданнях України, 7 доповідей та тез в збірниках матеріалів конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена на 139 сторінках друкованого тексту і складається з вступу, огляду літератури, основної частини (включаючи матеріали і методи досліджень, результати власних досліджень і їх обговорення), висновків, списку використаних джерел, який містить 336 посилань та додатку А. Робота включає 18 таблиць та 27 рисунків.

РОЗДІЛ 1.
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ
ПРОТЕКТОРНА РОЛЬ БІОПРЕПАРАТІВ У ЗАХИСТІ ЯЧМЕНЮ ВІД
ДІЇ СТРЕС-АГЕНТІВ

1.1. Ячмінь і перспективи його використання в різних сферах промисловості

Ячмінь – одна з цінних культур, відібраних з диких трав, яка активно використовувалася ще на початку введення злакових в сільське господарство. Вважається, що цей злак був важливою продовольчою культурою ще в 8000 році до нашої ери в регіоні Середземномор'я / Близького Сходу. Завдяки толерантності ячменю до солоності, вже до 1800 р. до н.е. цей злак став домінуючим в зрошуваних районах південної Месопотамії [240, 302, 304, 333]. Ячмінь займає п'яте місце по виробництву зерна в світі після кукурудзи, пшениці, рису та сої [117, 319]. Щорічна продукція цієї культури сягнула понад 144 млн. тонн в 2014 році, а провідними виробниками за кількістю продукції є Росія, Франція, Німеччина, Австралія та Україна [299].

В даний час ячмінь – четверта за значимістю культура зернових в світі, вирощується в більш ніж 100 країнах. За останнє десятиліття Європа виробила близько 60% світового тоннажу ячменю, а Азія і Америка – 15% і 13% відповідно [159, 308]. На сьогоднішній день близько 94% світового виробництва ячменю в основному використовується для виробництва пива, згідно зі "статистикою Євросолоду", і лише 2% використовується для споживання людиною [184, 228].

Однак уже давно відомо, що ячмінь у вигляді різних продуктів, біодобавок і кормів позитивно впливає на здоров'я людини і тварин. Наприклад, високий вміст β -глюкану в зерні цього злаку знижує рівень холестерину і, відповідно, ризик розвитку серцево-судинних захворювань. Інші біологічно активні сполуки цієї культури позитивно впливають на метаболізм глюкози у людини, знижуючи швидкість всмоктування вуглеводу

в кров, стабілізуючи цим рівень цукру [86, 101, 295, 301]. Крім цього, відомі й інші позитивні ефекти. Відповідно все це робить ячмінь дуже цікавою культурою для дієтології.

Продуктивність сільськогосподарських культур знижується через кліматичні зміни, а чисельність населення щодня збільшується, що призводить до проблем голоду в слаборозвинених країнах [90, 145, 162, 224].

Сільськогосподарське виробництво зернових обмежене широким спектром абіотичних і біотичних факторів стресу, включаючи посуху [124, 317], холод [82, 201, 294], спеку, солоність [84, 203, 237], дисбаланс в мінеральному живленні, вірусні [195, 202, 320] і грибкові захворювання [149, 262, 326], які часто мають комбіновану дію в польових умовах [102, 244]. Ці фактори призводять до зниження середньої врожайності основних культур по всьому світу на 50% [157, 239].

1.1.1. Характеристики ячменю

Ячмінь – це однорічна трава, висота якої становить 60-120 см [123, 172, 174]. Рослина відноситься до роду *Hordeum* сімейства *Poaceae*. Сюди також належить група рослин, що містять кілька економічно важливих злаків і кормових культур, а також близько 350 диких видів [132, 169, 232]. До роду *Hordeum* належать як однорічні види (*H. vulgare* і *H. marinum*), так і багаторічні (*H. bulbosum*).



Рис. 1.1 – Колос ячменю: дворядний і шестирядний [211]

Ячмінне колосся або "колоски" можуть давати одне або три зерна на вузол, даючи сорти "дворядні" або "шестирядний", тоді як пшениця є більш гнучкою, даючи кілька зерен на вузол.

Найбільш часто вирощується дворядний ячмінь. Його в основному використовують для приготування продуктів харчування, при цьому необхідна якість і ціна змінюються в залежності від продукту. Єдине нинішнє використання шестирядного ячменю – висів для випасу худоби [87, 189, 269].

Генетична трансформація зернових культур, опосередкована агробактеріями, в значній мірі обмежена певними генотипами, які поєднують здатність до передачі генів *Agrobacterium* з адекватним потенціалом регенерації [173]. На відміну від пшениці, ячмінь має ген 5,1 Гв. У 2012 році був опублікований детальний проект генома ячменю [125, 329].

1.1.2. Життєвий цикл розвитку ячменю

Ріст і розвиток ячменю – складний процес. Протягом життєвого циклу цієї злакової культури багато етапів росту перекриваються [240, 269].

Шкала онтогенезу дає загальне керівництво для опису стадій зростання. У всьому світі використовуються різні класифікації фаз росту, серед яких найбільш поширеними є Фекс, Садик і Хауна. Онтогенез рослин ячменю позначається різними способами, включаючи стадії росту (GS) і десятковий код [87, 243, 254].

Цикл росту ячменю має наступні етапи: схожість, повні сходи, кущіння, подовження стебла, вихід в трубку, поява колоса, цвітіння, молочна і воскова стиглість зерна, дозрівання (табл. 1.1; рис. 1.2) [167, 240].

Таблиця 1.1

Опис етапів і стадій росту ячменю [87]

СТАДІЯ РОСТУ (Growth stage-GS)									
Опис фази	Схожість	Повні сходи					Кущіння		
	GS 0-09	GS 10	GS 11	GS 13	GS 15	GS 19	GS 21	GS 25	GS 29
	Поява першого кореня	1 лист колеоптиль	1 лист розгорнуто (видно язичок)	3 лист розгорнуто	5 лист розгорнуто	9 або більше листів розгорнуто	Головний пагін і 1 відросток	Головний пагін і 5 відростків	Головний пагін і 5 відростків або більше
СТАДІЯ РОСТУ (Growth stage-GS)									
Опис фази	Подовження стебла					Вихід в трубку			
	GS 31	GS 33	GS 35	GS 37	GS 39	GS 41	GS 43	GS 45	GS 49
	Перший вузол	Третій вузол	П'ятий вузол	Видно прапорцевий лист	Повний вихід прапорцевої листової пластини	Подовження прапорцевого листка	Збільшення оболонки прапорцевого листка	Набухання оболонки прапорцевого листка	Видно перша ость
СТАДІЯ РОСТУ (Growth stage-GS)									
Опис фази	Поява колоса					Цвітіння			
	GS 51		GS 55		GS 59	GS 61	GS 65		GS 69
	Видно перший колосок		Вихід половини колоска		Повний вихід колоска	Початок цвітіння	Часткове цвітіння		Повне цвітіння
СТАДІЯ РОСТУ (Growth stage-GS)									
Опис фази	Молочна стиглість				Воскова стиглість зерна			Дозрівання	
	GS 71	GS 73	GS 75	GS 77	GS 83	GS 85	GS 87	GS 91	GS 92
	Водяниста стиглість зерна	Рання молочна	Середня молочна	Пізня молочна	Рання стиглість	М'яка стиглість	Тверда стиглість	Зерно тверде (важко розділити)	Зерно тверде (без вмятин)



Рис. 1.2 – Стадії росту ячменю [87]

1.1.3. Антиоксидантний комплекс рослин ячменю

Фізичні, хімічні та біологічні методи використовуються для усунення пошкоджень рослин, викликаних фітостресом [187, 215]. Значна частина сільськогосподарської біотехнології пов'язана з мікробними біопрепаратами для рослинництва, які є одним з важливих компонентів екологічного землеробства [209, 235]. Мікроорганізми, що входять до складу таких препаратів, мають здатність фіксувати молекулярний азот, покращувати мінеральне живлення рослин, синтезувати широкий спектр біологічно активних речовин, які сприяють підвищенню врожайності і поліпшенню якості сільськогосподарської продукції [91, 108, 284]. Крім того, екзометаболіти ризосферних бактерій можуть підвищувати стрес-толерантність рослин [225, 271].

Таким чином, створення і використання препаратів, що перешкоджають розвитку фітостресу, є актуальним завданням сучасного рослинництва. Однак антиоксидантний потенціал таких біопрепаратів в цілому недостатньо вивчений. Відповідно, аналіз антиоксидантних і антирадикальних властивостей мікроорганізмів-компонентів таких препаратів дозволить деталізувати механізми антистресової дії на рослини.

Рослини давно стали джерелом екзогенних антиоксидантів (An). Вважається, що дві третини світових видів рослин мають лікарське значення, і майже всі вони мають потужний антиоксидантний потенціал [191, 256].

Роль An полягає у видаленні агресивних по відношенню до важливих біологічних молекул (ДНК, протеїни, ліпіди) вільних радикалів ($R\cdot$). Блокування $R\cdot$ антиоксидантами в основному відбувається за допомогою електронно-донорного механізму або відщеплення атома водню. В результаті цих складних процесів з радикала утворюється нейтральна низькорекційна молекула [216, 222, 253]. Антиоксиданти пригнічують велику кількість активних форм кисню: синглетний кисень (1O_2), супероксидний аніон-радикал ($O_2^{\cdot-}$), пероксидне ($ROO\cdot$) і гідроксильний ($\cdot OH$) радикали, гідроген пероксид (H_2O_2), пероксинітрит ($ONOOH$) та інші [216, 261].

Редокс-гомеостаз рослин підтримується комплексом An, який складається з високомолекулярних (каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза (SOD)) і низькомолекулярних протекторів (амінокислоти, вітаміни, пігменти, глутатіон, фенольні сполуки) [160, 208].

Активність супероксиддисмутази (SOD), каталази (CAT) і глутатіон пероксидази (GPX) становить систему антиоксидантного захисту першої лінії, яка грає ключову і фундаментальну роль в загальні механізми і стратегії захисту в біологічних системах [179].

Особливий інтерес серед різних метаболітів рослин представляють фенольні сполуки (Ph-OH). Згідно з даними літератури, ці речовини мають широкий спектр властивостей, серед яких особливо виділяються антиоксидантні [200, 285, 291].

Одним з найбагатших джерел фенольних сполук серед зернових є ячмінь. У його рослинах і зерні містяться фенолкарбонові кислоти (похідні бензойної та коричної кислоти), проантоціанідіни, дубильні речовини, флавоноїди, халькони, флаволи, флаванони і амінофенольні з'єднання. Антирадикальна активність Ph-OH ячменю по відношенню до $DPHN\cdot$ і

ABTS⁺⁺ була порівнянна з синтетичним антиоксидантом, бутильованим гідрокситолуол (BHT) [144, 290].

Zeng з співавторами встановили, що високі дози УФ ініціюють в молодих рослинах ячменю підвищення вмісту флавоноїдів-антиоксидантів: лутонаріна і сапонаріна. Останній відомий своєю протидією розвитку онкології, запалень і серцево-судинних захворювань. Як підсумок, метанольні екстракти з листя ячменю можуть стати альтернативою синтетичним фармацевтичним лікам і антиоксидантам в харчовій промисловості [331].

1.1.4. Сенсibilізація рослин ячменю до різних стрес-факторів

Збалансованість роботи антиоксидантного комплексу в умовах фітостресу грає важливу роль в підтримці життєздатності рослин. Однак тривалу дію оксидантів порушує редокс-цикл [221].

Наслідки стресу можуть привести до дефіциту росту, врожаю, або взагалі до загибелі, якщо шкідлива дія стрес-агентів перевищить межі фітотолерантності. Однією з важливих завдань сучасної сільськогосподарської науки є підвищення стійкості зернових культур до впливу абіотичних стресів (грунтова посуха, заморозки, засолення, ефекти важких металів, УФ-радіація, гербіциди та затоплення) [59, 65, 95]. В останні роки посилюється кліматична нестабільність, а ріст кількості погодних аномалій призводить до порушень метаболізму рослин і зниження їхньої продуктивності [46]. Рослина може піддаватися стресу ще на початковому етапі онтогенезу, втрачати здатність до проростання на стадії насіння в результаті накопичення дегенеративних змін.

Сільськогосподарське виробництво ячменю (*Hordeum vulgare*) сильно обмежене як різними абіотичними, так і біотичними факторами стресу. До абіотичних факторів відносяться різні фактори навколишнього середовища (опаді, хімічні добрива, сонячна радіація / температура і потоки повітряних мас). До біотичних факторів – інші живі організми, що негативно впливають

на рослини (фітопатогенні віруси, гриби, бактерії та комахи-паразити) [188, 203]. Ці стрес-фактори можуть знижувати середній урожай на 50% [114, 210].

Розвиток фітостресу викликає глибокі зміни в білковій структурі ячменю, що охоплює передачу сигналів, енергетичний метаболізм (гліколіз, цикл Кребса, біосинтез АТФ, фотосинтез), білковий синтез та впливає на регуляцію росту і розвитку рослин [203]. Також це заважає рослинам проявляти свій максимальний генетичний потенціал.

Великі втрати зерна ячменю часто викликані аномальними температурними режимами, зниженим рівнем кисню, дисбалансом солей в ґрунті. Реакції рослин, викликані цими стресами, включають негативні зміни в механізмах транспірації, фотосинтезу, дихання і гормональної регуляції. Тривалість стресу на кожній стадії росту рослин впливає на врожайність [114, 210].

Основи нормального росту і розвитку рослин закладаються при отриманні повної та дружньої врожайності, що забезпечується високою якістю посівного матеріалу. При проростанні якісного насіння відбувається швидкий перехід зрілого життєздатного насіння зі стану вимушеного спокою в стан активної життєдіяльності до інтенсивного зростання проростка. Тому вивчення різних сторін фізіології проростання насіння, розробка ефективних методів їх попередньої обробки з метою нормального розвитку проростків має велике значення [48].

Насіння на стадії проростання найбільш чутливі до впливу різних екологічних чинників, які здатні викликати пошкодження в організмі рослин [19]. Оскільки в цей період в клітинах насіння відбуваються великі енергетичні витрати, відповідно здатність їх до реалізації захисно-адаптаційних механізмів знижується [80]. Наростаюча дія стрес-факторів ініціює збільшення рівня АФК, серед яких особливий інтерес представляє пероксид водню.

У рослинах, H_2O_2 в допустимих концентраціях діє як сигнальна молекула, яка бере участь в різних біохімічних і фізіологічних процесах.

Вона задіяна в кількох клітинних механізмах, як в умовах стресу, так і при його відсутності. Крім того, зміна рівня H_2O_2 може вплинути на метаболічну і антиоксидантну активність ензимів, пов'язаних з ростом і розвитком рослин [242].

Передбачається, що пероксид водню відіграє подвійну роль в рослинах. При низьких концентраціях він, мабуть, діє як сигнальний месенджер, що запускає толерантність до різноманітних стресів навколишнього середовища [146, 190], тоді як при високих – ця молекула керує запрограмованою загибеллю клітин [147]. У багатьох роботах повідомляється, що екзогенне застосування H_2O_2 може поліпшити проростання насіння як в неактивному, так і в активному насінні [23].

1.2. Використання біологічних препаратів в технології аграрного виробництва ячменю

1.2.1. Класифікація сучасних засобів захисту рослин

В останні десятиліття почався пошук підходів, які об'єднують інтенсивні способи вирощування сільськогосподарських культур з прийомами, які знижують небезпеку для них факторів навколишнього середовища. Величезні можливості відкриває використання екологічно чистих біологічних препаратів, що сприяють підвищенню стійкості до абіотичних і біотичних стрес-факторів, збільшення врожайності і поліпшенню якості зерна.

Використання біопрепаратів в агроєкосистемі ярого ячменю призводить до поліпшення формування продуктивного стеблостою і відповідно показників структури врожаю. Обробка насіння ячменю перед посівом і вже вегетуючих рослин бактеріальними препаратами сприятливо впливає на кущистість, що в подальшому визначає продуктивність колоса [63].

У всіх системах сільського господарства найважливішою умовою отримання високих врожаїв є комплексний захист сільськогосподарських

культур від фітопатогенних бактерій і вірусів (біотичний стрес-фактор), включаючи організаційні, економічні, селекційні, агротехнічні заходи.

Сучасні препарати для захисту рослин від шкідливих організмів умовно можна розділити на 3 групи. До першої відносяться пестициди з явною біоцидною дією, що знищують цільові «шкідливі» організми. Ефективність їх використання досить висока. Однак вони завдають шкоди і «корисним» видам в агроценозах, що є їх основим «мінусом», мають слабку ступінь використання в природних співтовариствах, а також накопичуються в продуктах харчування. За даними ФАО-ВОЗ, залишки пестицидів виявляються майже в 40% їжі, що вживається. У зв'язку з цим в рослинництві стали вводити фунгіциди системної дії, менш токсичні і здатні більш швидко утилізуватися рослинами. Однак їх використання пов'язане з матеріальними витратами, оскільки вони дорогі, та згодом виникає стійкість патогенів до їх дії. Це ініціює до пошуку нових хімічних засобів захисту рослин (ХЗЗР) [1].

Друга група засобів захисту рослин включає штучно синтезовані низькомолекулярні речовини, які можуть стимулювати імунний потенціал рослин. Згідно з однією з класифікацій [15] такі препарати умовно поділяються на такі, що: підвищують стійкість клітинних стінок рослин до атаки збудника за рахунок накопичення в заражених тканинах кремнію або лігніну; активують синтез фенольних сполук; індукують синтез фітоалексинів; адаптують рослини до атаки збудника; каталізують гідролази рослин.

За словами [42], індукція стійкості рослин до системних хвороб за допомогою таких синтетиків має ряд переваг перед пестицидами. До їх числа слід віднести: низький рівень небезпеки для людей, тварин, корисних комах і для довкілля; здатність викликати стійкість у рослин-господарів, позбавлених генів стійкості, до хвороботворних агентів за рахунок активації альтернативних сигнальних шляхів; здатність відновлювати існуючий потенціал рослин на горизонтальному рівні, створюючи для них більш

довготривалий захист, ніж при використанні фунгіцидів; поліфункціональність, тобто формування неспецифічної стійкості рослин до комплексу патогенів та фітофагів.

У третю групу включені препарати, до складу яких входять живі культури мікроорганізмів (бактерії, гриби) [41, 104, 109, 248, 255, 275, 309].

Їх захисна дія обумовлена здатністю синтезувати:

- антибіотичні сполуки пептидної природи;
- різні сідерофори і хелатор, які сприяють засвоєнню рослинами макро і мікроелементів, включаючи кальцій, залізо або, навпаки, зв'язують важкі метали або токсичні органічні речовини;
- речовини, які переводять фосфор з нерозчинного стану в розчинний;
- ферменти-гідролази, що руйнують клітинні стінки патогенів (хітинази, р-1,3-глюканаза), а також їх токсини;
- регулятори росту і різні сигнальні молекули (ауксини, гібереліни, цитокініни, абсцизова (ABK), саліцилова (SC) і жасминова (PC) кислоти);
- ензими, які сприяють синтезу етилену в рослинах і т. д.

Принцип дії препаратів другого і третього класів відрізняється від класичних ХЗЗР, так як має на меті визначення чисельності мікроорганізмів, формування конкурентних відносин з аборигенною патогенною мікофлорою, індукування природної системної стійкості. Більшість з них працює як тригери, що запускають каскад захисних реакцій [41, 69]. Багато з відомих сучасних біопрепаратів, зокрема, на основі ендofітів, поєднують, як правило, в собі всі зазначені вище властивості [15, 18, 109, 135, 150, 311].

Вчені в останні роки створили бактеріальні препарати, застосування яких забезпечує підвищення врожайності сільськогосподарських культур [64]. Основні механізми дії мікроорганізмів-компонентів цих препаратів на рослини полягають у наступному: поліпшення азотного живлення (фіксація атмосферного азоту); оптимізація фосфорного харчування; стимуляція зростання і розвитку, придушення фітопатогенів, підвищення коефіцієнтів

використання елементів живлення з добрив і ґрунту, збільшення стійкості рослин до стресових умов [10, 17, 26, 27, 28, 29].

Біопрепарати позитивно впливають на схожість насіння та утворення коренів рослин, знижуючи розвиток коренових гнилей. Інокулянти стимулюють збільшення біомаси рослин по фазах вегетації, при цьому характер їх дії визначається видом використовуваного препарату, а також штамом мікроорганізмів і сортовими особливостями рослин [16].

У ряді дослідів з ячменем на різних типах ґрунту встановлено, що в результаті інокуляції посівного матеріалу біопрепаратами ризосферних діазотроф на початку вегетації зміни концентрації азоту (N), фосфору (P) і калію (K) в рослинах не відбувалося, тобто вони в цей період не впливали на умови мінерального живлення. Однак в більш пізні фази (наприклад, виходу в трубку і колосіння) вміст азоту в органах і тканинах рослин починав збільшуватися [108, 250, 313]. Інокуляція насіння ячменю флавобактерієм або препаратами на основі псевдомонад підвищувала концентрацію в рослинах P і K, що знаходило відображення на енергетичному обміні, підвищенні стійкості до хвороб і несприятливих факторів середовища [88, 315].

В цілому при інокуляції насіння завдяки позитивній дії мікроорганізмів рослини споживають більшу кількість елементів живлення, що створює передумови до підвищення врожаю, в порівнянні з неінокулірованим насінням. Таким чином, біопрепарати позитивно впливають на врожайність сільськогосподарських культур, покращують якість одержуваної продукції, збільшують окупність мінеральних добрив надбавкою урожаю [17].

Якість комплексних мікробних препаратів в значній мірі визначається їх препаративною формою. Важливим складовим більшості біопрепаратів є тверді носії (торф, перліт, вермикуліт, палигорськіт і др.). Ці вискодисперсні матеріали надають позитивний вплив на фізіолого-біохімічні властивості мікроорганізмів. Особливий інтерес серед компонентів, які використовуються для виготовлення біопрепаратів, викликає бентоніт [298].

Цей глинистий мінерал має високу сполучну здатність, термічну стійкість, а також абсорбційну і каталітичну активність [9]. Також він в сукупності з бактеріями *B. subtilis* IMB B-7023 і *A. vinelandii* IMB B-7026 входить до складу високоефективного нанокompозитного комплексного бактеріального препарату Азогран. Однак вплив бентоніту на антиоксидантний потенціал цих штамів не вивчено.

1.2.2. Характеристики біопрепаратів, які використовують в агроєкосистемі ячменю для зниження негативного впливу стрес-факторів

Сьогодні в інтенсивних агротехнологіях істотно розширився спектр завдань, що вирішуються тільки з використанням високоефективних біопрепаратів комплексної дії [45]. Вивчення реакцій рослин на періодично виникаючі в вегетаційний період стресові ситуації необхідно для розробки способів, що знижують їх негативний вплив. Вирішення цієї проблеми в сучасних умовах сільськогосподарського виробництва тісно пов'язане з використанням мікробних препаратів. Згідно з даними літератури [32], бактерії, в порівнянні з рослинами, характеризуються більш широким спектром ензимних і неензимних систем антиоксидантного захисту, які менш чутливі до впливу стрес-агентів.

Серед біотичних агентів, супутніх розвитку фітостресу, слід віднести: борошнисту росу, сажкові хвороби, кореневі гнилі, фузаріоз, септоріоз, плямистості, буру іржу і інші.

Досліджувані біопрепарати для захисту рослин від цих фітопатогенів:

- Триходермін на основі гриба *Trichoderma lignorum*, штам ТД-93 (рідка форма); Гаупсин на основі неспорівих бактерій роду *Pseudomonas aureofaciens*, штам 2116;
- Бактофіт на основі спорівих бактерій роду *Bacillus*, штам ПІМ-215.

За роки досліджень на рослинах ячменю ярого було відзначено такі хвороби: плямистість листя, борошниста роса, кореневі гнилі. Дані свідчать,

що застосування біологічних препаратів при обробці насіння і 2-кратному обприскування посівів знижувало ураженість рослин плямистою і борошнистою росою в 1,5 – 2,0 рази [47]. Висока конкурентоспроможність біопрепаратів по відношенню до фітопатогенних грибів підвищує стійкість рослин до хвороб.

Аналіз ефективності біопрепаратів Екстрасол НС8 і БісолбіФіт в залежності від фону показав, що найбільші прибавки врожаю ярого ячменю були без внесення мінеральних добрив. У свою чергу дія біопрепарату Екстрасол Ч13 посилювалася з внесенням мінеральних добрив [60].

Біопрепарати (різоагрін, флавобактерін і Екстрасол 55) збільшують врожайність зерна ячменю:

- Різоагрін створений на основі штаму, що відноситься до роду *Agrobacterium radiobacter* - штам 204;
- Флавобактерін створений на основі штаму, що відноситься до роду *Flavobacterium* sp. - штам 30.

Механізм позитивної дії препарату визначається здатністю бактерій використовувати молекулярний азот, стимулювати зростання, продукувати фітогормони, покращувати мінеральне живлення, водний обмін і активізувати фізіологічні процеси рослин [61, 68, 73].

- Екстрасол 55 виготовляється на основі консорціуму ризосферних мікроорганізмів, включаючого високоактивні штами мікроорганізмів: *Pseudomonas fluorescens* 2137, *Bacillus subtilis* 413, *Flavobacterium* sp. L-30, *Agrobacterium radiobacter* 10204, *Arhtrobacter mysorens* 7 і продукти метоболізму. Екстрасол 55 підвищує схожість насіння, забезпечує ростостимулюючий ефект, збільшує стійкість рослин до несприятливих факторів зовнішнього середовища, підвищує стійкість рослин до хвороб: цвілі і гнилі насіння, снігової плісняви, церкоспоріллезу, гелмінтоспоріозні і фузаріозні гнилі [7, 24, 54].

Використання біопрепарату мікофіла на ячмені також підвищує ефективність фосфорних і вапняних добрив, при цьому збільшується не тільки врожайність культури, а й якість продукції [20].

Бінор Ж – мікробіологічний фунгіцид з ростостимулюючою дією для захисту рослин від хвороб. Він містить комплекс штамів ризосферних бактерій *Pseudomonas fluorescens*. Екологічно чистий природний препарат зменшує чисельність і розвиток патогенних грибів, підвищує схожість насіння, продуктивну кущистість, збільшує кількість зерен в колосі і масу насіння [52]. Біосил – регулятор росту і індуктор імунітету до комплексу грибних, бактеріальних і вірусних хвороб рослин [63].

Азогран (*A. vinelandii* IMB B-7076 + *B. subtilis* IMB B-7023) покращує живлення рослин азотом і фосфором, стимулює ріст і розвиток рослин, підвищує їх продуктивність, гальмує поширення в агроценозах ряду шкідників видів рослин-фітофагів; прискорює проростання насіння, розвиток рослин, цвітіння; збільшує врожайність овочевих, технічних і зернових культур на 18-37% [30].

Азогран виробляється в гранульованій, сипучій і суспензійній формі. Азогран покращує ріст і розвиток газонних трав, багатьох видів декоративних рослин, сіянців і садженців сосни і ялини, збільшує кількість квітконосних пагонів на трояндах на 26 – 47%, підвищує врожайність томатів на 37%, ярого ячменю – на 18%, озимої пшениці – на 20% [79, 207].

1.2.3. Механізми дії біопрепаратів, створених на основі стимулюючих ріст рослин мікроорганізмів

Останні досягнення в дослідженні взаємодії рослин з мікроорганізмами показали, що різні види рослин, які вирощуються на одному ґрунті, здатні формувати свій унікальний ризосферний мікробіом. Ці комплексні мікробні угруповання, іменовані другим геномом рослини, мають вирішальне значення в оптимізації продукційного процесу сільськогосподарських культур [199].

Ризосферні бактерії, які благотворно впливають на ріст рослин, називають ризобактеріями, що сприяють росту рослин (PGPR) і вивчаються як можливі інокулянти для підвищення їх продуктивності [66, 94, 199]. Вони являють собою гетерогенну групу бактерій, яка може бути виявлена в ризосфері, ризоплані і гітосфері. Крім ризосферних мікроорганізмів, PGPR бактерії також включають епіфіти – представники філосфери і ендوفіти, які можуть існувати у внутрішніх тканинах рослини [39, 273]. Протягом останніх років кількість бактеріальних видів, ідентифікованих як PGPR, значно зросла головним чином тому, що роль ризосфери як екосистеми стали розглядати як важливий фактор для функціонування біосфери.

Значення мікроорганізмів в оптимізації продукційного процесу сільськогосподарських культур важко переоцінити, оскільки існування рослин без участі мікроорганізмів неможливо. Мікробні перетворення поживних речовин є ключовим фактором зростання і розвитку рослин, сприяє збільшенню продуктивності екосистем [183]. Крім забезпечення біогенними елементами, що впливають на ріст і розвиток рослини-господаря, бактерії здатні продукувати фізіологічно активні речовини, які регулюють цілий ряд процесів життєдіяльності рослин [25, 76, 249]. З іншого боку, ексудати рослин містять широкий спектр органічних сполук, які є субстратом і факторами росту для мікробних популяцій [103, 107]. Ексудати коренів рослин містять флавоноїди і терпеноїди – компоненти, що використовуються в стратегіях хімічної комунікації з ґрунтовою мікробіотою [225].

Мікроорганізми утворюють особливу форму організації – біоплівку, яка формується на кореневій системі і виконує багато життєво важливих функцій для рослин, зокрема забезпечує захист рослин від фітопатогенних мікроорганізмів. Крім того, утворення біоплівки на кореневих волосках значно покращує контакт коренів з ґрунтом, підвищуючи поглинання біогенних речовин, сприяє поліпшенню живлення рослин [138].

Регуляція росту рослин за участю мікроорганізмів включає три механізми: ростостимуляція, поглинання поживних речовин і антагонізм

[316]. Прямі механізми забезпечення безпосереднього стимулювання росту рослин включають: фіксацію азоту, фосфатмобілізацію, синтез ауксинів, цитокінінів, гібереліни, сідерофори, АЦК-деамінази та ін. [247]. Непрямі механізми: обмеження функціонування фітопатогенних мікроорганізмів в результаті синтезу антибіотиків, сідерофори, токсинів, літичних ензимів, активація системної індукованої резистентності [249, 260].

Здатність до стимуляції росту рослин і збільшення продуктивності сільськогосподарських культур властива для бактерій родів: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Bejerinckia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Lactobacillus*, *Mezorhizobium* та ін. [6, 37, 194]. Але найбільшу ефективність серед групи PGPR зазвичай виявляють види, які належать до домінуючих родів бактерій *Pseudomonas* та *Bacillus*, стрептоміцетів *Streptomyces* і мікроміцетів *Trichoderma* [83, 234]. Зокрема, представники роду *Pseudomonas* і *Bacillus* демонструють високу універсальність в їх метаболічній здатності, що забезпечує пригнічення росту шкідливих мікроорганізмів і підвищення доступності поживних речовин для рослини та стимулювання їх зростання [155]. Представники стрептоміцетів, що належить до роду *Streptomyces*, здатні утворювати багато видів вторинних метаболітів, таких як антибіотики, фітогормони, які покращують ріст рослин і здійснюють захист від фітопатогенних організмів [4, 180]. У біологічному контролі хвороб рослин часто використовуються види широко поширених мікроміцетів роду *Trichoderma*. Ґрунтові гриби здатні продукувати різноманітні біологічно активні речовини: амінокислоти, ензими, ліпіди, полісахариди, антибіотики, фітогормони, вітаміни, токсини [22, 175].

Формування продукційного процесу рослин в першу чергу залежить від розвитку симбіотичних та асоціативних азотфіксуючих мікроорганізмів [40, 164]. Серед несимбіотичних фіксаторів азоту бактерії родів *Azotobacter* і *Azospirillum* мають найбільше практичне значення, оскільки разом з

фіксацією азоту вони також підвищують ріст рослин шляхом синтезу фітогормонів [204, 263].

Крім того, що PGPR здатні захищати рослини від шкідливого впливу деяких екологічних факторів, вони синтезують широкий спектр біологічно активних речовин, які запобігають дегенеративні процеси і покращують клітинний ріст рослин при несприятливих умовах [296, 314].

Нещодавно в практику запроваджено термін "неіндукована системна резистентність", для позначення процесу, в якому PGPR полегшують негативний вплив фітопатогенів шляхом активації механізму опору в рослинах. В організмі фітооб'єктів синтезується саліцилова і жасмонова кислоти, етилен, індукується синтез білків, що пригнічують розвиток фітопатогенів (відзначається посилення лігніфікації кореневої тканини і підвищення вмісту фітоалексинів в стеблах) [170, 249, 310]. Таким чином, формування продукційного процесу рослин може бути покращено шляхом безпосереднього застосування біопрепаратів, створених на основі мікроорганізмів - регуляторів росту і розвитку рослин.

Одним з перспективних напрямків щодо підвищення стресостійкості рослин є використання екологічно чистих технологій, які базуються на створенні високоефективних мікробних препаратів. Однак їх антиоксидантні потенціали мало вивчені. Тому дослідження антиоксидантних і антирадикальних властивостей таких препаратів дозволить отримати більш детальну інформацію їх протекторної ролі в агроєкосистемах різних рослин.

Метою даної роботи було дослідження антиоксидантної статусу високоефективних штамів фосфатмобілізуючих бактерій *B. subtilis* IMB B-7023 і азотфіксуючих бактерій *A. vinelandii* IMB B-7026, що є компонентами комплексного бактеріального препарату Азогран і його протекторної ролі в агроєкосистемі ячменю.

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти досліджень

Штами бактерій: *B. subtilis* IMB B-7023 виділено з чорноземного ґрунту (підтип: типовий чорнозем, що має 6 – 9 % гумусу) (Черкаська область, Україна). Штам підтримується у відділі мікробіологічних процесів на твердих поверхнях IMB ім. Д.К. Заболотного НАН України є компонентом комплексного бактеріального препарату Азогран для рослинництва [43]; *A. vinelandii* IMB B-7076, виділені з ризосфери цукрових буряків у відділі мікробіологічних процесів на твердих поверхнях IMB ім. Д.К. Заболотного НАН України є також компонентом комплексного бактеріального препарату Азогран для рослинництва [44].

Дисперсний наноструктурований мінерал бентоніт це – різновид мінералів групи монтморилоніту. У роботі використовували бентоніт Душківського родовища (Черкаська область). Розмір наночастинок бентоніту склав 28,92 – 99,21 нм [57].

Використовували насіння зернової культури ярого ячменю: сортів Віраж (Україна), Бурхант (Монголія), Копленд (Канада).

Нанокмпозитний комплексний бактеріальний препарат Азогран.

2.2. Умови культивування мікроорганізмів

Склад агаризованих і рідких середовищ для вирощування мікроорганізмів. При дослідженні впливу наноматеріалу бентоніту на антиоксидантний потенціал метаболітного комплексу *B. subtilis* IMB B-7023, бактерії культивували в модифікованому рідкому поживному середовищі Менкіної [21, 36, 77], г/л: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; NaCl – 0,3; KCl – 0,3; CaCO_3 – 5,0; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; FeSO_4 – 0,001; глюкоза – 10,0; гліцерофосфат натрію – 2,0; дистильована вода – 1 л; pH 7,0 – 7,2.

Висів суспензії досліджуваних штамів бацил проводили на картопляний агар (КА) [12], г/л: очищена картопля – 200,0; CaCO_3 – 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; агар-агар – 15,0; водогінна вода – 1 л; pH 6,8 – 7,2.

При дослідженні впливу наноматеріалу бентоніту на антиоксидантний потенціал метаболітного комплексу *A. vinelandii* IMB B-7076, бактерії культивували в рідкому поживному середовищі Берка [53], г/л: $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,64; KH_2PO_4 – 0,16; NaCl – 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ – 0,005; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,003; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; сахароза – 20,0; дистильована вода – 1 л; pH 7,0 – 7,2.

Висів суспензії досліджуваного штаму азотобактера проводили на агаризованому середовищі Ешбі [53], г/л: сахароза – 20,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; NaCl – 0,2; K_2SO_4 – 0,1; CaCO_3 – 5,0; дистильована вода – 1 л. До цього середовища вносили 1 мл розчину мікроелементів (по Федорову) наступного складу: H_3BO_3 – 5,0; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 5,0; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; KJ – 0,5; NaBr – 0,54; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; дистильована вода – 1 л; pH 7,2 – 7,3.

Культивування досліджуваних штамів бактерій в рідких живильних середовищах проводили на роторних качалках ($n=240$ об/хв) у колбах Ерленмейера об'ємом 750 мл або в мікробіологічних пробірках, в які вносили по 20 мл середовища. В якості інокулюму використовували 18-годинну культуру бактерій. Кількість життєздатних клітин визначали методом висіву суспензій бактерій на агаризовані середовища з серійними десятикратними розведеннями. Після культивування посівів при відповідній температурі проводили підрахунок колоній (колонієутворюючих одиниць, КУО) на поверхні агаризованого середовища в тому розведенні, де їх кількість становила від 30 до 300. Досліджувані штами бацил і азотобактера вирощували на агаризованих середовищах, використовуючи чашки Петрі чи пробірки із скошеним агаризованим середовищем (по 20 мл середовища у кожену) впродовж 24-72 годин при температурі $+28 \pm 1^\circ\text{C}$. Зберігали культури при температурі $+4^\circ\text{C}$.

*Метод отримання культуральних середовищ (метаболітних комплексів) штамів бактерій *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 і *Bacillus subtilis* IMB B-7023.* Культуральні рідини (КР) штамів бактерій *A. vinelandii* IMB B-7076 звільняли від клітин шляхом центрифугування на центрифугі УЦП-50 при 15 тис об/хв 30 хв. КР *B. subtilis* IMB B-7023 звільняли від клітин шляхом центрифугування на центрифугі ОПн-8 (ОАО "ТНК Дастан", Киргизстан) – при 5000 об/хв 15 хв. по методиці [57, 182].

Підготовка дисперсного наноматеріалу бентоніт. Наважку сухого наноматеріалу бентоніт вносили в колби об'ємом 250 мл і тричі автоклавували при 1,0 атм. Розміри частинок мінералу вимірювали з використанням трансмісійного електронного мікроскопу JEM-1400 (Jeol, Японія) [57].

Культивування бактерій з дисперсним глинистим мінералом бентоніт. Бентоніт вносили в живильне середовище перед його стерилізацією в концентрації 0,05 – 0,5 г/л. Культивування бактерій здійснювали за методикою, наведеною в підрозділі 2.2. Штами *A. vinelandii* IMB B-7076 і *B. subtilis* IMB B-7023 культивували протягом 48 годин при температурі $28 \pm 1^\circ\text{C}$ [2; 35; 79].

2.3. Оцінка антиоксидантних властивостей культуральних середовищ (метаболітних комплексів) *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 і *Bacillus subtilis* IMB B-7023

Метод визначення антирадикальної активності (АРА). Антирадикальну активність КС *A. vinelandii* IMB B-7076 і *B. subtilis* IMB B-7023 визначали за методом [280], використовуючи стабільний 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил радикал (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical, DPPH·).

В основі взаємодії антиоксидантів (An) з DPPH· лежить донорно-акцепторний механізм. Радикал акцептує лабільний атом гідрогену від An з утворенням стабільної діамангнітної молекули: $\text{DPPH}^\cdot + \text{An} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^\cdot$ і дотриманням закону збереження заряду [166].

В скляні пробірки вносили 1 мл 0,1 мМ етанольного розчину DPPH·, змішували з 3 мл КС досліджуваного штаму бацил або азотобактера та залишали при кімнатній температурі на 30 хв. В контрольну пробу замість КС бактерій вносили 3 мл поживного середовища. Інтенсивність зміни фіолетового забарвлення етанольного розчину DPPH· до яскраво жовтого кольору реєстрували при довжині хвилі 517 нм. Зниження абсорбції дослідних зразків свідчило про їх високу АРА по відношенню до DPPH·.

АРА виражали у відсотках згідно розрахункової формули:

$$ARA = \left[1 - \left(\frac{E_d}{E_k} \right) \right] \cdot 100\% ,$$

де Ек та Ед– абсорбція, відповідно, контрольної та дослідної проб.

Відновлювальна здатність бактерій. Відновну здатність КС *A. vinelandii* IMB B-7076 визначали згідно методу Oyaizu [251]. В скляні пробірки, які містили 2,5 мл 0,2 М фосфатного буферу (рН 6,6) та 2,5 мл 1% розчину калій гексаціаноферату (ІІІ) ($K_3 [Fe^{3+} (CN)_6]$), вносили 1 мл КС азотобактера. Після інкубування при +50°C впродовж 20 хв в проби додавали по 2,5 мл 10% ТХО і центрифугували на центрифугі ОПн-8 (ОАО "ТНК Дастан", Киргизстан) при 1000 об/хв 10 хв. Відбирали 2,5 мл супернатанту, змішували з 2,5 мл дистильованої води та 0,5 мл 0,1% розчину $FeCl_3$. Визначали здатність КС *A. vinelandii* IMB B-7076 відновлювати $K_3[Fe^{3+}(CN)_6]$ до $K_4[Fe^{2+}(CN)_6]$ (калій гексаціаноферату (ІІ)) при довжині хвилі 700 нм. Підвищення абсорбції реакційної суміші свідчило про зростання відновлювальної здатності.

Визначення метал-хелатуючої активності бактерій. Метал-хелатуючу активність метаболітного комплексу *A. vinelandii* IMB B-7076 визначали за методом з виключенням того, що хлорид заліза (ІІ) замінили на сульфат заліза (ІІ) [152, 186].

Ферозін може формувати з іонами заліза комплекси червоного кольору. Однак у присутності хелатуючих агентів відбувається руйнування комплексу, яке супроводжується зниженням інтенсивності його забарвлення. Вимірювання інтенсивності зміни червоного кольору дозволяє дати оцінку

здатності зв'язування іонів металів змінної валентності досліджуваним хелатором.

У скляні пробірки вносили 2 мл КС *A. vinelandii* IMB B-7076 і 0,05 мл 2 мм розчину $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Реакцію ініціювали внесенням 0,2 мл 5мМ розчину феррозіна. Суміш енергійно струшували і залишали при кімнатній температурі на 10 хв. До контрольної проби замість КС азотобактера вносили 2 мл живильного середовища. Отримані зразки спектрофотометрували на спектрофотометрі СФ-46 (ОАО "ЛОМО", Росія) при довжині хвилі 562 нм. Відсоток інгібування освітлення ферозін- Fe^{2+} комплексу розраховували за формулою:

$$\% \text{ інгібування} = \frac{E_k - E_o}{E_k} \times 100\% ,$$

де E_k і E_o – абсорбція, відповідно, контрольної і дослідної проб.

Визначення активності перехоплення гідроксильного радикалу ($\cdot\text{OH}$) в реакції Фентона. Активність перехоплення OH в реакції Фентона досліджували згідно методу, описаному в роботі [283] з деякими модифікаціями [330].

Гідроксильний радикал генерували в середовищі, яке містило 1 мл 1,5 мМ FeSO_4 ; 0,7 мл 6 мМ H_2O_2 ; 0,3 мл 20 мМ натрій саліцилату та 3 мл КС *B. subtilis* IMB B-7023. В контрольний зразок вносили 3 мл поживного середовища. Після інкубування при $+37^\circ\text{C}$ впродовж 1 години в реакційній суміші визначали вміст гідроксильованого саліцилатного комплексу при довжині хвилі 562 нм. Активність перехоплення радикала гідроксила в реакції Фентона виражали у відсотках згідно розрахункової формули:

$$\text{АРА} \cdot \text{OH} = \left[\frac{(E_k - E_d)}{E_k} \right] \cdot 100\% ,$$

де E_k та E_d – абсорбція, відповідно, контрольної та дослідної проб.

*Метод визначення загального вмісту сполук фенольної природи в культуральному середовищі *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 і *Bacillus subtilis* IMB B-7023.* Загальний вміст сполук фенольної природи в КС

A. vinelandii IMB B-7076 і *B. subtilis* IMB B-7023 визначали за методом Folin-Ciocalteu в модифікації Singleton і Rossi [93, 272, 292].

В основі методу лежить реакція фенолів з реактивом Фоліна-Чокальтеу. Вміст сполук фенольної природи розраховували за допомогою калібрувальної кривої, яку будували, використовуючи хімічно чисту галову кислоту. Абсорбцію зразків вимірювали при довжині хвилі 765 нм. Результати виражали в мкг-еквівалентах галової кислоти на 1 мл КС *A. vinelandii* IMB B-7076 або *B. subtilis* IMB B-7023 (мкг-екв/мл).

2.4. Квантово-хімічні розрахунки термодинамічних показників антиоксидантних механізмів для 2,3-дигідрокси-6-метил(4H)-піран-4-ону (DDMP) - метаболіту *Bacillus subtilis* IMB B-7023

Квантово-хімічні розрахунки термодинамічних показників антиоксидантних механізмів для 2,3-дигідрокси-6-метил (4H)-піран-4-ону. Квантово-хімічний аналіз антиоксидантних і антирадикальних властивостей 2,3-дигідрокси-6-метил-(4H)-піран-4-ону (DDMP) проводили за допомогою програмного пакету Gaussian 09W [161]. Повну оптимізацію геометрії нейтральної молекули DDMP в її основному стані проводили до мінімуму за методом теорії функціональної густини (Density Functional Theory, DFT), розрахункової моделі обмеженого (restricted, r) методу теорії функціоналу густини Беке (B3), яка використовує електронну кореляцію Лі Янга і Пара (LYP) та базисного набору 6-311++g(2d,2p): rB3LYP/6-311++g(2d,2p). Обмеження (r) визначається відсутністю неспарених електронів, тобто розраховуються системи із замкнутою оболонкою [213].

Однак для оптимізації геометрії радикала та катіон-радикалу DDMP використовували розрахункову модель необмеженого (unrestricted, u) методу теорії функціоналу густини Беке: uB3LYP/6-311++g(2d,2p), оскільки ці системи з відкритими оболонками, тобто мають неспарені електрони [213].

Для оптимізованих структур DDMP розраховували фізико-хімічні показники перебігу можливих антиоксидантних механізмів.

Зокрема це:

- Ентальпія дисоціації О-Н зв'язку (Bond Dissociation Enthalpy, BDE)

розраховувалася за формулою: $BDE = H_{ArO\cdot} + H_H - H_{ArOH}$,

де $H_{ArO\cdot}$ – ентальпія радикалу, який виник внаслідок дисоціації атома водню від антиоксиданта; H_H – ентальпія атома водню; H_{ArOH} – ентальпія нейтральної сполуки антиоксиданта.

- Адіабатичний потенціал іонізації (Adiabatic Ionization Potential, AIP)

розраховувався за формулою: $AIP = H_{ArOH^{+\cdot}} + H_{e^-} - H_{ArOH}$,

де $H_{ArOH^{+\cdot}}$ – ентальпія катіон-радикалу; H_{e^-} – ентальпія дисоціації електрону; H_{ArOH} – ентальпія нейтральної сполуки антиоксиданта [229].

- Ентальпія дисоціації протону (Proton Dissociation Enthalpy, PDE)

розраховувалася за формулою: $PDE = H_{ArO\cdot} + H_{H^+} - H_{ArOH^+}$,

де $H_{ArO\cdot}$ – ентальпія радикалу; який виник внаслідок дисоціації протона від антиоксиданта; H_H – ентальпія водню; H_{ArOH^+} – ентальпія катіон-радикалу [229].

Всі розраховані значення пропонувались отримувати для умов вакууму при 298 K°. Результати квантово-хімічних розрахунків, які проведені в умовах вакууму, можуть бути пов'язані з антиоксидантними ефектами досліджуваної сполуки в неполярному середовищі ліпідно-пептидних мембран живих клітин [230].

Ми використовували наступні константи ентальпій: $H_{(H)} \text{ вакуум} = -0,49764$ На (Хартрі) [324]; $H_{(H^+)} \text{ вакуум} = 0,00236$ На [197]; $H(e^-) = 0,00119$ На [110]. Відповідно, $1 \text{ На} = 627,51 \text{ ккал/моль} = 27,211 \text{ еВ}$.

2.5. Дослідження антиоксидантної дії нанокompозитного комплексного бактеріального препарату Азогран на насіння різних сортів ярового ячменю

З метою дослідної перевірки ефективності впливу створеного в НАН України нанокompозитного бактеріального препарату комплексної дії на ріст і врожайність різних сортів ярого ячменю в відділі мікробіологічних процесів

на твердих поверхнях було виготовлено дослідну партію біопрепарату Азогран. Цей препарат створений на основі азотфіксуючих бактерій *A. vinelandii* IMB B-7076 і фосфатмобілізуєчих бактерій *B. subtilis* IMB B-7023 [43, 44].

Чисельність життєздатних клітин в 1 г препарату становила:

- *A. vinelandii* IMB B-7076 – $(3,1 \pm 0,1) \cdot 10^7$ кл/мл;
- *B. subtilis* IMB B-7023 – $(3,4 \pm 0,1) \cdot 10^7$ кл/мл.

У роботі використовували насіння ярого ячменю сортів Бурхант (Монголія), Віраж (Україна), Копленд (Канада). У першій серії дослідів відбирали по 50 насіння кожного сорту і обробляли пероксиду водню (6%, 20% і 33%) протягом 30 хв. Насіння промивали тричі фізіологічним розчином і розкладали на змочену стерильною дистильованою водою фільтрувальний папір для проростання при $t=20^{\circ}\text{C}$. Експерименти проводили в лабораторних умовах в триразовою повторністю [14].

У другій серії дослідів рослини 3 сортів ячменю вирощували в умовах теплиці. Попередньо посівний матеріал піддавали обробці згідно зі схемою:

Контроль – насіння, оброблене стерильною дистильованою водою (H_2O);

Насіння, бактеризоване нанокмпозитним комплексним бактеріальним препаратом Азогран (**CX**);

Насіння, оброблене 33% перекисом водню протягом 30 хв. (H_2O_2);

Насіння, піддане дії 33% перекису водню (30 хв.) і бактеризованим 3 мл нанокмпозитним комплексним бактеріальним препаратом Азогран протягом 1 год ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{CX}$).

Насіння кожного сорту ячменю висівали в 4-х повторностях по 50 шт. в рядку. У процесі росту ячменю відзначали наступні фази: GS-24 – куціння, GS-45 – вихід в трубку, GS-61 – цвітіння, GS-87 – воскова стиглість, GS-91 – дозрівання. Час кожної фази розвитку рослин ячменю відзначали за методикою, прописаною в роботі [328]. У кожній з фаз досліджували висоту

рослин. Збирання і облік урожаю проводили в фазі повної стиглості з ділянки, відповідно за традиційними методиками вручну [13].

Фенологічні спостереження:

- Посів ячменю – 17.05.19;
- Схожість (поява першого кореня) – 26.05.19 (GS-09);
- Подовження стебла (вихід прапорцевої листкової пластини) – 25.06.19 (GS-39);
- Вихід в трубку (набухання оболонки прапорцевого листка) – 01.07.19 (GS-45);
- Цвітіння (початок цвітіння) – 17.07.19 (GS-61);
- Колосіння (пізня молочна стиглість) – 02.08.19 (GS-77);
- Збір врожаю (зерно тверде без вм'ятин) – 17.08.19 (GS-92).

2.6. Метод отримання метанольних екстрактів з рослин різних сортів ячменю

Рослини відбирали у фазі вихода в трубку і сушили при кімнатній температурі (22°C) без доступу прямих променів світла до постійної ваги. Проби подрібнювали до порошкоподібного стану за допомогою електричної кавомолки Saturn ST-CM1031 (220 – 240 В, 50 Гц, China). З кожного варіанту відбирали наважку (1 г) і розділяли на 2 частини по 0,5 г.

1 частина (екстракція вільної фракції фенольних сполук): наважка (0,5 г) кожного із зразків рослин ячменю вносили в круглодонні колби зі зворотним холодильником і двічі екстрагували метанолом (50 мл/проба) при температурі водяної бані 67,4°C протягом 2 годин. Загальний обсяг екстракту (100 мл) фільтрували через фільтрувальний папір №1 за допомогою воронки Бюхнера. Отриманий фільтрат упарюють до сухого стану на ротаційному випарнику IP-1M2 (ВО «ХІМЛАБОРПРІБОР», СРСР). Сухий залишок перерозчиняли в 2 мл метанолу і віддавали на ВЕРХ-аналіз;

2 частина (екстракція зв'язаної фракції фенольних сполук): наважку (0,5 г) кожного із зразків рослин ячменю вносили в круглодонні колби зі

зворотним холодильником і піддавали кислотному гідролізу, доливаючи 30 мл суміші 2М HCl:CH₃OH (1:1). Присутність метанолу дозволяє запобігти руйнуванню деяких фенолкарбонових кислот. Гідроліз проводили при температурі 90°C протягом 2 годин. Гідролізати фільтрували через фільтрувальний папір №1 за допомогою воронки Бюхнера. Отримані фільтрати піддавали 3-х разовій екстракції за допомогою етилацетату (30 мл/проба) протягом 30 хв. Екстракти упарювали до сухого стану на ротаційному випарнику IP-1M2 (ВО «ХІМЛАБОРПРІБОР», СРСР). Сухий залишок перерозчиняли в 2 мл метанолу і віддавали на ВЕРХ-аналіз.

2.7. Метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) фенолкарбонових кислот в метанольних екстрактах рослин різних сортів ячменю

Отримані екстракти центрифугували при 3000 об/хв і фільтрували через одноразові мембранні фільтри з порами 0,22 мкм.

Рідинну хроматографію проводили на рідинному хроматографі Agilent Technologies 1200. В якості рухомої фази використовували метанол (А) і 0,1% розчин мурашиної кислоти у воді (В). Елюювання проводили в градієнтному режимі: 0 хв – А (25%): В (75%); 25 хв – А (75%): В (25%); 27 хв – А (100%): В (0%); 35 хв – А (100%): В (0%).

Поділ проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-Aq (4,6 мм×150 мм, 3,5 мкм) (Agilent Technologies, USA), швидкість потоку через колонку 0,5 мл/хв., температура термостата 30°C, обсяг інжекції 4 мкл. Детекцію проводили з використанням діод-матричного детектора з реєстрацією сигналу при 250 і 275 нм і фіксацією спектрів поглинання в діапазоні 210 – 700 нм [33, 217, 287].

Ідентифікацію та кількісний аналіз проводили з використанням стандартних розчинів фенольних сполук (галової, 4-гідроксифенілоцтової, хлорогенової, кавової, сірінгової, п-кумарової, транс-ферулової, сінапової, транс-коричної кислот).

2.8. Високоєфективна рідинна хроматографія флавоноїдів в метанольних екстрактах рослин різних сортів ячменю

Отримані екстракти центрифугували при 3000 об/хв і фільтрували через одноразові мембранні фільтри з порами 0,22 мкм.

Рідинну хроматографію проводили на рідинному хроматографі Agilent Technologies 1200. В якості рухомої фази використовували ацетонітрил (А) і 0,1% розчин мурашиної кислоти у воді (В).

Елюювання проводили в градієнтному режимі: 0 хв – А (30%): В (70%); 20 хв – А (70%): В (30%); 22 хв – А (100%): В (0%); 30 хв – А (100%): В (0%). Поділ проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-C18 (3,5 мкм, 150x4,6 мм) (Agilent Technologies, USA), швидкість потоку через колонку 0,25 мл/хв., температура термостату 30°C, обсяг інжекції 4 мкл. Детекцію проводили з використанням діод-матричного детектора з реєстрацією сигналу при 280 і 365 нм і фіксацією спектрів поглинання в діапазоні 210 – 700 нм [33].

Ідентифікацію та кількісний аналіз проводили з використанням стандартних розчинів флавоноїдів (рутину, кверцетин-3-*b*-глікозиду (ізокверцетин), нарингину, неогесперидину, кверцетину, нарингеніну, каемпферола, лютеоліна, апигеніна).

2.9. Статистична обробка результатів

Для статистичного аналізу результатів досліджень використовували методи варіаційної статистики, визначаючи середні арифметичні величини (\bar{X}), їх середньоквадратичні відхилення (S_x) і середньоквадратичні похибки (m) [31]. Також статистичну обробку даних проводили з допомогою комп'ютерної програми Statistic 6.0. Використання методу непараметричної статистики проводилося за критерієм Манні – Уїтні за допомогою пакету програм "Statistic V.6".

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Вплив наноструктурованого мінералу бентоніт на антиоксидантні властивості *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 і *Bacillus subtilis* IMB B-7023

В експериментах з пророщуванням ячменю використовувався нанокомпозитний комплексний бактеріальний препарат Азогран, одним із компонентів якого є бентоніт. Бентонітові глини є цінним видом мінеральної сировини, обсяги світового використання якої перевищують 1 млн. тонн. Завдяки широкому спектру характерних для бентоніту властивостей, налічується понад 200 напрямків застосування цього наноматеріалу. Зокрема, в сільському господарстві [62].

Бентоніт це природний шарувато-силікатний наноматеріал, що має унікальні властивості (адсорбційні, реологічні, в'язучі та ін.), які обумовлені наноструктурою мінералу монтморилоніту – основного компоненту бентонітових глин [11,12, 49]. У роботі використовували бентоніт з розміру часток в діапазоні від 42,8 до 92,3 нм.

На основі бентоніту і двох високоефективних штамів бактерій *A. vinelandii* IMB B-7076 і *B. subtilis* IMB B-7023 в відділі мікробіологічних процесів на твердих поверхнях був створений нанокомпозитний комплексний бактеріальний препарат Азогран для активації росту рослин і поліпшення їх продуктивності. Однак вплив глинистого мінералу на антиоксидантний потенціал метаболітного комплексу бактерій-компонентів біопрепарату раніше не досліджувався. А сьогодні вивчення концепції взаємодії наноматеріалів з живими організмами є надзвичайно важливою проблемою [321]. На першому етапі роботи було цікаво встановити, як змінюється ростова активність *A. vinelandii* IMB B-7076 і *B. subtilis* IMB B-7023, а також показники антиоксидантного потенціалу метаболітних комплексів цих бактерій при їх культивуванні з різними концентраціями бентоніту.

3.1.1. Залежність антиоксидантного потенціалу метаболітного комплексу *Azotobacter vinelandii* IMB-7076 від вмісту бентоніту в живильному середовищі

Встановлено, що при культивуванні *A. vinelandii* IMB B-7076 з 0,05 – 0,5 г/л бентоніту чисельність бактерій істотно не змінювалася. Так, якщо ростову активність контрольного варіанту прийняти за 100%, то при внесенні 0,5 г/л наноматеріалу в живильне середовище цей показник зростав тільки на 4,3% (табл. 3.1).

Результати даних досліджень свідчать також про те, що при культивуванні штаму *A. vinelandii* IMB B-7076 з 0,05 г/л наноматеріалу, вміст Ph-ОН в його КС зростав до 117,2 мкг/мл і перевищував сумарну кількість фенольних компонентів в КС контрольного варіанту на 32,1%, відповідно. У той же час, при внесенні 0,1 і 0,5 г/л бентоніту бактерії синтезували менше фенолів – на 4,7 і 15,0%, в порівнянні з попереднім варіантом. Однак їх кількість була більша, ніж в КС контрольного зразка, на 27,4 – 16,5% (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Вплив бентоніту на ростову активність *Azotobacter vinelandii* IMBV-7076 і загальний вміст фенольних сполук в його культуральному середовищі

Вміст бентоніту, г/л	Чисельність бактерій, КУО/мл	Вміст фенольних сполук, мкг/мл
0	$(6,9 \pm 0,5) \times 10^8$	$85,1 \pm 3,2$
0,05	$(3,9 \pm 0,5) \times 10^8$	$117,2 \pm 4,5$
0,1	$(4,1 \pm 0,9) \times 10^8$	$112,5 \pm 2,8$
0,5	$(7,2 \pm 0,7) \times 10^8$	$101,6 \pm 4,8$

Фенольні сполуки і ряд інших метаболітів живих клітин відіграють важливу роль в їх захисту від АФК. Найбільш чутливим і швидким методом визначення антирадикальної активності (АРА) біологічного матеріалу є інактивації вільних радикалів [120, 133, 193, 280].

Нами встановлено, що бентоніт обумовлює суттєвий ефект на АРА антиоксидантного комплексу *A. vinelandii* ІМВ В-7076 по відношенню до DPPH·. При внесенні в живильне середовище 0,05 г/л наноматеріалу АРА зросла на 8,5%, в порівнянні з контролем. Коли вміст наноструктурованого мінералу досяг 0,1 г/л, досліджуваний показник антиоксидантного потенціалу незначно знижувався в порівнянні з аналогічним при 0,05 г/л бентоніту, але перевищував АРА антиоксидантного комплексу контрольного зразку на 5,7%. Однак, при внесенні 0,5 г/л наноматеріалу АРА антиоксидантного комплексу *A. vinelandii* ІМВ В-7076 по відношенню до DPPH· знижувалася на 11,6 – 8,6% в порівнянні з показниками АРА при 0,05 – 0,1 г/л бентоніту і на 3,1% по відношенню до контролю (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Антирадикальна активність антиоксидантного комплексу *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 при різному вмісті бентоніту в живильному середовищі

Вміст бентоніту, г/л	АРА DPPH·, %
0	57,6 ± 4,4
0,05	66,1 ± 0,6 *
0,1	63,3 ± 1,9 *
0,5	54,5 ± 0,9

Помітний вплив бентоніт проявляв на відновну здатність антиоксидантного комплексу *A. vinelandii* ІМВ В-7076. Так, відновна здатність контрольного варіанту становила 0,824 і прирівнювалася до 100%. При культивуванні бактерій з 0,05 – 0,1 г/л наноматеріалу досліджуваний показник зростав в порівнянні з контрольним, і становив 112,0 – 120,6%. Зі збільшенням вмісту мінералу в живильному середовищі до 0,5 г/л відновна активність антиоксидантного комплексу досліджуваного штаму була вище, ніж у контролі, на 37,1% (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Відновлювальна здатність антиоксидантного комплексу *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 при різному вмісті бентоніту в живильному середовищі

Вміст бентоніту, г/л	Абсорбція, 700 нм	% до контролю
0	$0,824 \pm 0,020$	100,0
0,05	$0,923 \pm 0,047 *$	112,0
0,1	$0,994 \pm 0,047 *$	120,6
0,5	$1,130 \pm 0,050 **$	137,1

Встановлено, що метал-хелатуюча активність антиоксидантного комплексу *A. vinelandii* IMB B-7076 зростала зі збільшенням вмісту в живильному середовищі бентоніту. Так, при культивуванні бактерій з 0,05 – 0,5 г/л наноматеріалу, досліджуваний показник був вище, ніж у контролі на 13,6 – 35,1% (табл. 3.4). Отримані результати збігаються з даними відновної здатності антиоксидантної комплексу *A. vinelandii* IMB B-7076. Ці два антиоксидантні показники можна розглядати як 2-стадійний механізм блокування зародження реакції Фентона через контроль за її ініціаторами – іонами Fe^{2+} . Відповідно, відновна здатність біологічного матеріалу спрямована на відновлення іонів $\text{F}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, а метал-хелатуюча – на хелатування Fe^{2+} , як іонів змінної валентності [186, 208].

Таблиця 3.4

Метал-хелатуюча активність антиоксидантного комплексу *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 при різному вмісті бентоніту в живильному середовищі

Вміст бентоніту, г/л	Метал-хелатуюча активність, %
0	$44,2 \pm 7,4$
0,05	$57,8 \pm 2,3 *$
0,1	$78,0 \pm 11,1 **$
0,5	$79,3 \pm 4,8 **$

3.1.2. Вплив різних концентрацій бентоніту на антиоксидантні властивості метаболітного комплексу *Bacillus subtilis* IMB B-7023

Виявлено концентраційно залежні ефекти досліджуваного глинистого наноматеріалу від його вмісту в живильному середовищі в діапазоні 0,05 – 0,5 г/л на зростання *B. subtilis* IMB B-7023. Встановлено, що досліджуваний показник у варіанті, який не містив глинистого мінералу, становив $(1,4 \pm 0,1) \times 10^{10}$ кл/мл, а при внесенні 0,5 г/л бентоніту дещо знижувався – $(1,0 \pm 0,1) \times 10^{10}$ кл/мл. Тоді ж як при концентрації мінералу 0,05 – 0,1 г/л кількість життєздатних клітин бацил знижувалася (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Вплив бентоніту на ростову активність *Bacillus subtilis* IMB B-7023

Вміст бентоніту, г/л	Чисельність бактерій, КУО/мл
0	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^{10}$
0,05	$(5,0 \pm 1,2) \times 10^9$ **
0,1	$(3,5 \pm 0,3) \times 10^9$ *
0,5	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{10}$

Примітка: початкова концентрація бактерій в середовищі становила $(1,7 \pm 0,3) \times 10^7$ кл/мл.

Крім того, при вирощуванні бацил з різними концентрації бентоніту була встановлена пряма залежність між загальним вмістом сполук фенольної природи в метаболітних комплексах бацил і його АРА по відношенні до $\cdot\text{ОН}$ і $\text{DPPH}\cdot$. При внесенні 0,05 г/л наноматеріалу в живильне середовище концентрація Ph-ОН збільшилася на 17,3%, а активність перехоплення $\cdot\text{ОН}$ і $\text{DPPH}\cdot$ – на 3,1% і на 15%, у порівнянні з контролем. Культивування *B. subtilis* IMB B-7023 з 0,5 г/л глинистого мінералу супроводжувалося зниженням загальної кількості фенольних метаболітів на 4,5 мкг/мл і АРА по відношенню до радикалу гідроксилу – на 7,9%, по відношенню до контрольного варіанту. Однак АРА до $\text{DPPH}\cdot$ залишалася вищою, ніж в контролі (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Залежність між загальним вмістом сполук фенольної природи в метаболітному комплексі *Bacillus subtilis* IMB B-7023 і його антирадикальної активності від концентрації бентоніту

Вміст бентоніту, г/л	Ph-OH, мкг/мл	АРА (\cdot OH), %	АРА (DPPH \cdot), %
0	21,4 \pm 2,1	31,4 \pm 0,8	29,6 \pm 1,8
0,05	25,1 \pm 1,6	34,5 \pm 1,1	44,6 \pm 3,1
0,1	18,6 \pm 2,1	28,3 \pm 1,4	41,7 \pm 3,8
0,5	16,9 \pm 1,8	23,5 \pm 1,2	35,4 \pm 0,8

Іншу закономірність спостерігали щодо впливу бентоніту на АРА метаболітного комплексу *B. subtilis* IMB B-7023 по відношенню до ABTS \cdot^+ . Виявлено, що з підвищенням вмісту наноматеріалу досліджуваний показник знижувався на 3,5 – 15,3% в порівнянні з контролем (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Вплив різних концентрацій бентоніту на антирадикальну активність метаболітного комплексу *Bacillus subtilis* IMB B-7023 по відношенню до ABTS \cdot^+

Вміст бентоніту, г/л	АРА (ABTS \cdot^+), %
0	86,7 \pm 0,4
0,05	83,2 \pm 2,1 *
0,1	79,2 \pm 5,3 *
0,5	71,4 \pm 3,5 **

Використовуючи метод вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), нами визначено вміст окремих фенольних кислот в метанольних екстрактах метаболітного комплексу *B. subtilis* IMB B-7023, отриманого після культивування бацил з різними концентраціями бентоніту. Встановлено, що

досліджений глинистий мінерал не впливав на якісний склад виявлених сполук фенольної і бензойної природи, а лише на їх кількісний вміст.

Так, в метанольному екстракті контрольного зразку (метаболітного комплексу бактерій, які вирощували в живильному середовищі без додавання наноматеріалів) були присутні: галова – 8,49 мкг/мл; 4-гідроксіфенілоцтова (4-ГФОК) – 1,15 мкг/мл і транс-корична кислоти – 0,57 мкг/мл (рис. 3.1).

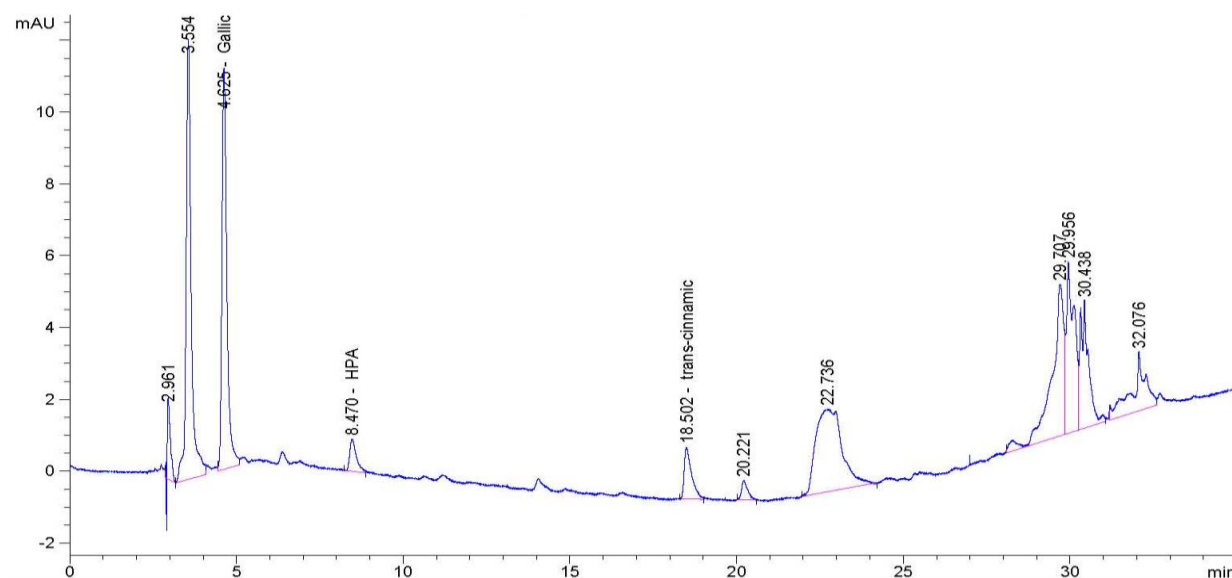


Рис. 3.1 – ВЕРХ-аналіз вмісту фенольних кислот в метанольному екстракті метаболітного комплексу *Bacillus subtilis* IMB B-7023

При культивуванні досліджуваного штаму з 0,05 г/л бентоніту, в метанольному екстракті метаболітного комплексу бактерій спостерігали збільшення вмісту виявлених фенольних метаболітів. Відповідно, концентрація галової кислоти зростала на 12,9%, транс-коричної – на 54,4%, а 4-ГФО - практично не змінювалася щодо контрольного варіанту (рис. 3.2).

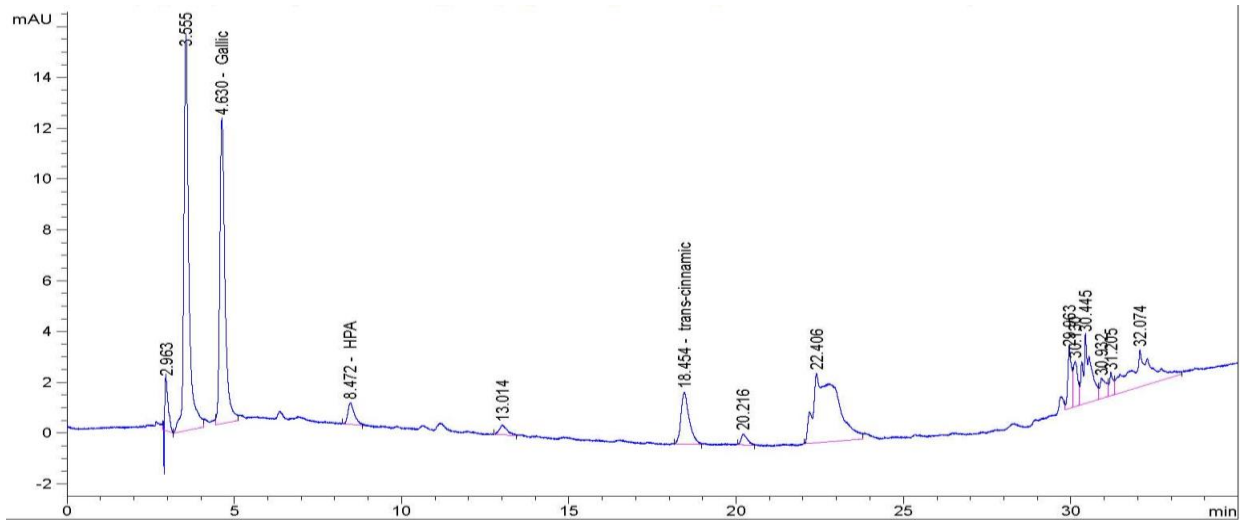


Рис. 3.2 – ВЕРХ-аналіз вмісту фенольних кислот в метанольному екстракті метаболітного комплексу *Bacillus subtilis* IMB V-7023 при культивуванні бактерій з 0,05 г/л бентоніту

Внесення в живильне середовище 0,5 г/л наноструктурованого мінералу супроводжувалося збільшенням кількості галової і 4-ГФО кислоти на 31,9%, 54,8% і зниженням транс-коричної – на 35,1%, в порівнянні з контролем (рис.3.3).

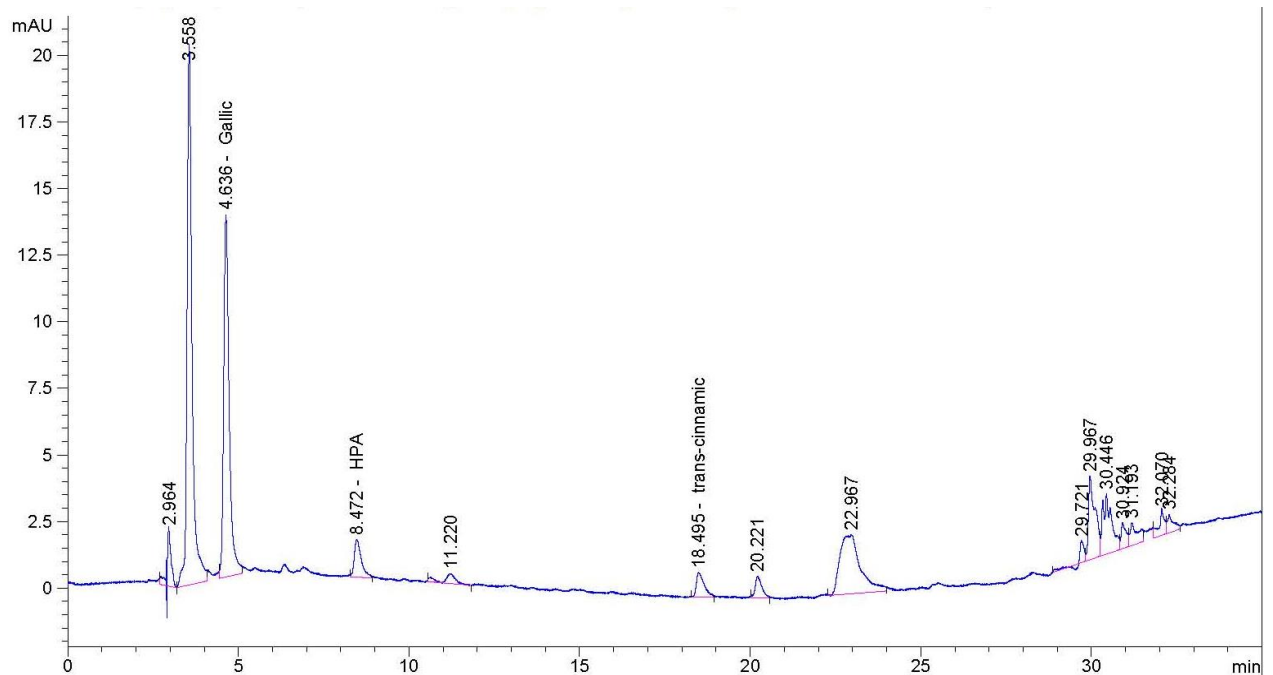


Рис. 3.3 – ВЕРХ-аналіз вмісту фенольних кислот в метанольному екстракті метаболітного комплексу *Bacillus subtilis* IMB V-7023 при культивуванні бактерій з 0,5 г/л бентоніту

Культивування штаму *B. subtilis* ІМВ В-7023 з різними концентраціями бентонітової глини супроводжувалося вираженим концентраційно залежним ефектом. При низькому вмісті наноматеріалу в живильному середовищі (0,05 – 0,1 г/л) спостерігали в основному активацію антиоксидантного потенціалу метаболітного комплексу бацил. Тоді ж як високий вміст частинок бентоніту ($\geq 0,5$ г/л) знижує антиоксидантні властивості бактерій.

3.1.2.1. Дослідження антиоксидантних властивостей 2,3-дигідрокси-6-метил-(4Н)-піран-4-ону – унікального метаболіту *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023

Стабільність окислювально-відновного гомеостазу в клітинах мікроорганізмів відіграє важливу роль у безлічі біохімічних процесів. Його дисбаланс супроводжується підвищенням рівня активних форм кисню (АФК), які можуть проявляти токсичну дію на мембранні ліпіди, білки і нуклеїнові кислоти [281].

У більшості мікроорганізмів, зокрема бактерій роду *Bacillus*, одним з ефективних механізмів захисту клітин від агресивних оксидантів є функціонування захисного комплексу, який складається з ензимів і різних низькомолекулярних антиоксидантів. Бацили є широко розповсюдженими представниками ґрунтової мікрофлори. Антиоксидантні системи цих бактерій можуть діяти як ефективні інгібітори стрес-агентів у різних культур рослин [81]. Однак, на сьогодні недостатньо інформації про механізми інактивації АФК антиоксидантами метаболітного комплексу бактерій роду *Bacillus*.

Відповідно, виникає важливе питання в дослідженні можливої антиоксидантної активності окремих з'єднань, що синтезуються бацилами. Об'єктом нашої експериментальної роботи став штам *B. subtilis* ІМВ В-7023 – компонент високоефективного комплексного бактеріального препарату Азогран. За допомогою хроматографічних методів в метаболітному комплексі цих бактерій був ідентифікований 2,3-дигідро-3,5-дигідрокси-6-

метил-4 (Н)-піран-4-он (2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-(4H)-pyran-4-one, DDMP) (табл.3.8), який був описаний [51]. Цей унікальний метаболіт відноситься до флавоноїдної фракції, оскільки його хімічна структура ідентична флавоноїдному С-кільцю (рис. 3.4), описана у [336].

Таблиця 3.8

Хроматограма етанольного екстракту метаболітного комплексу

Bacillus subtilis IMB B-7023 [51]

Сполуки	Час виходу піку, хв	Площа піку, %	Імовірність ідентифікації, %
DDMP	4,40	10,47	95
5-гідроксиетил-2-фуранкарбоксальдегід	4,94	39,22	62
фенілоцтова кислота	5,06	18,88	87
не ідентифікована	6,60	11,55	53
4-Гідроксифенілоцтова кислота	6,81	4,41	64
не ідентифікована	7,08	7,75	40

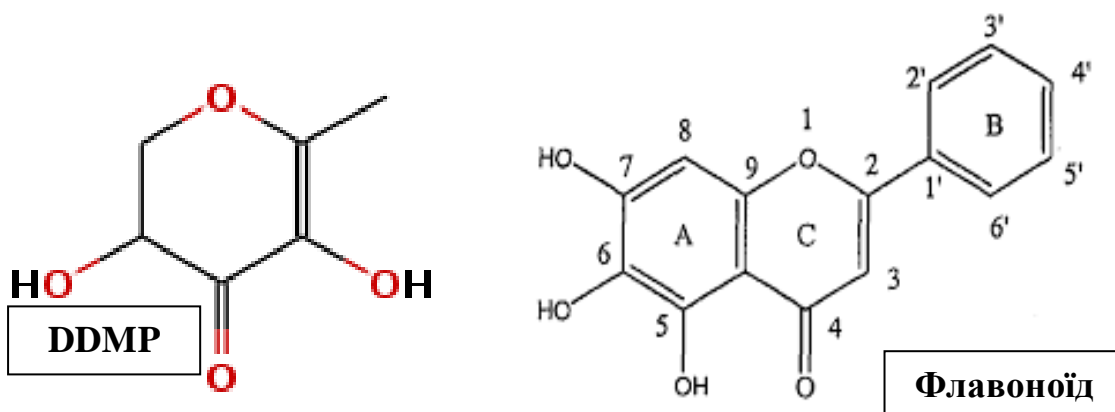


Рис. 3.4 – Хімічна структура 2,3-дигідро-3,5-дигідрокси-6-метил-4 (Н)-піран-4-ону в порівнянні із загальною структурою флавоноїдів [336].

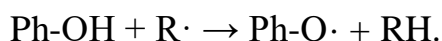
DDMP був вперше ідентифікований з *Phaseolus coccineus* [327]. Згідно з даними літератури [105, 118, 206, 259, 289, 293], це з'єднання характеризується антимуtagenною, анти-альфа-глюкозидазною, протипухлинною, антимікробною, а також антиоксидантною активностями.

Однак, не до кінця зрозуміло, за допомогою яких біохімічних реакцій DDMP елімінує агресивні оксиданти.

Не так давно для вивчення антиоксидантного потенціалу різних сполук широко застосовується метод теорії функціональної щільності (Density Functional Theory, DFT). Теоретичне дослідження дає інформацію щодо антиоксидантної активності в дуже короткі терміни, легко і економічно, з розумною точністю.

Базовими є три механізми, за допомогою яких різні антиоксиданти можуть інактивувати АФК:

- Перенесення атома водню (Hydrogen Atom Transfer, HAT):



В ході реакції вільний радикал ($\text{R}\cdot$) акцептує атом водню від з'єднання фенольної природи (Ph-OH), в результаті формується стабільний і мало реактивний феноксильний радикал ($\text{Ph-O}\cdot$) і нейтральна форма $\text{R}\cdot$ - (RH). Важливим термодинамічним показником цього механізму є ентальпія гемолітичної дисоціації О-Н зв'язку (Bond Dissociation Enthalpy, BDE). Оскільки чим слабкіший є О-Н зв'язок в структурі антиоксиданту, тим легше буде відбуватися інактивація $\text{R}\cdot$ [231, 324].

Розрахунок BDE 2,3-дигідро-3,5-дигідрокси-6-метил-4 (H)-піран-4-ону дозволив охарактеризувати стабільність 3-ОН і 5-ОН зв'язків в гідроксильних групах. Встановлено, що показник дисоціації 3-ОН зв'язку був дуже високим – 107,4 ккал/моль, що свідчить про нездатність гідроксильної групи в цьому положенні брати участь в реакціях інактивації АФК. Ентальпія гемолітичної дисоціації 5-ОН зв'язку становила 82,4 ккал/моль і перевищувала BDE гідроксильних груп в цьому положенні для Моріна, галангіна і каемферола на 5,36; 6,25 і 6,09 ккал/моль (табл. 3.9). Отримані результати вказують на низьку здатність DDMP інактивувати вільні радикали з допомогою механізму HAT.

Таблиця 3.9

Ентальпія дисоціації О-Н зв'язку 2,3-дигідро-3,5-дигідрокси-6-метил-4 (Н)-піран-4-ону в порівнянні з різними флавоноїдами

№	Сполука	BDE (5-OH), ккал/моль
1	Морін	77,04 [219]
2	Галангін	76,15 [153]
3	Каемферол	76,31 [153]
4	DDMP	82,4

Примітка. Розрахунок BDE проводили в умовах вакууму при 298 К° відповідно до теорії B3LYP/6-311++g (2d, 2p) [153, 219] .

- Механізм одноелектронного переносу (Single electron transfer, SET) відбувається по реакції: $\text{Ph-OH} + \text{R}\cdot \rightarrow \text{Ph-OH}^{\cdot+} + \text{R}^-$. Фенольний антиоксидант віддає вільному R електрон, трансформуючи його в аніонну форму, а сам переходить в стан стабільного феноксільного катіон-радикалу, який не реагує з субстратом молекул. Оскільки реакція передбачає формування іонів, адіабатичний потенціал іонізації (Adiabatic Ionization Potential, AIP) антиоксидантних сполук стає параметром для прогнозування можливості речовин фенольної природи перехоплювати вільні $\text{R}\cdot$ за допомогою механізму SET [324]. Низькі числові значення AIP вказують на легке відщеплення електрона і високу АРА антиоксидантів [307]. Розрахунок AIP включає в себе інформацію про ефективність перехоплення вільних $\text{R}\cdot$ фенольними сполуками.

Встановлено, що адіабатичний потенціал іонізації DDMP незначно перевищував AIP моріна і таксіфоліна на 5,2 і 0,7 ккал/моль. Однак цей показник був нижчим, ніж в нарингеніна і апігеніна на 10,6 і 14,4 ккал/моль (табл. 3.10). Це вказує на потенційну можливість DDMP інактивувати стрес-агенти через механізм SET.

Таблиця 3.10

Адіабатичний потенціал іонізації 2,3-дигідро-3,5-дигідрокси-6-метил-4 (Н)-піран-4-ону в порівнянні з різними флавоноїдами

№	Сполука	AIP, ккал/моль
1	Морін	181,9 [219]
2	Таксіфолін	186,4 [297]
3	DDMP	187,1
4	Нарингенін	197,7 [241]
6	Апігенін	201,5 [219]

Примітка. Розрахунок BDE проводили в умовах вакууму при 298 К° відповідно до теорії B3LYP/6-311++g (2d,2p) [219, 241, 297].

Також це було підтверджено розрахунком енергії верхньої зайнятої молекулярної орбіталі (Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO). Молекулам антиоксидантів з високою енергією HOMO властива сильна електронно-донорна здатність [278].

Згідно табл. 3.11, енергія HOMO для DDMP становила (-6,390 eV) і була дещо нижчою, ніж в галангіна і силібіну. Однак досліджуваний показник перевищував енергію HOMO для вітаміну С і цис, транс-цинарин на 0,150 і 0,507 eV. Отримані дані вказують на досить задовільну електронно-донорну здатність DDMP.

Таблиця 3.11

Енергія HOMO 2,3-дигідро-3,5-дигідрокси-6-метил-4 (Н)-піран-4-ону в порівнянні з різними флавоноїдами

№	Сполука	E _{HOMO} , eV
1	Галангін	-5,870 [153]
2	Силібін	-6,134 [229]
3	DDMP	-6,390
4	Вітамін С	-6,540 [98]
6	Цис, транс-цинарин	-6,897 [229]

Примітка. Розрахунок BDE проводили в умовах вакууму при 298 К° відповідно до теорії B3LYP/6-311++g (2d,2p) [98, 153, 229].

- Електронно-донорний механізм, який супроводжується відщепленням протона (H^+) (Single-electron transfer followed by proton transfer, SET-PT) і включає в себе 2 реакції [185, 214, 220, 227]:

I) відбувається за принципом механізму SET і визначає можливість протікання зазначеного механізму: $Ph-OH + R^{\cdot} \rightarrow Ph-OH^{\cdot+} + R^-$;

II) катіон-радикал фенольного з'єднання розпадається на феноксильний радикал і протон: $Ph-OH^{\cdot+} \rightarrow Ph-O^{\cdot} + H^+$, який, реагуючи з аніонною формою радикалу, переводить її в нейтральне з'єднання: $R^- + H^+ \rightarrow RH$.

Механізм SET-PT характеризують 2 термодинамічні параметри: адіабатичний іонізаційний потенціал (AIP) і ентальпія дисоціації протона (Proton Dissociation Enthalpy, PDE), яка описує здатність фенольного з'єднання віддавати H^+ . Низькі числові значення PDE вказують на легке відщеплення протона від молекули антиоксиданту. Слід зазначити, що хід механізму SET-PT в основному залежить від PDE [131].

Виходячи з результатів квантово-хімічних розрахунків адіабатичного іонізаційного потенціалу, DDMP притаманний механізм SET-PT. При цьому, ентальпія дисоціації H^+ для цього з'єднання становила 209,4 ккал/моль і незначно відрізнялася від PDE для моріна (210,9 ккал/моль), галангіна (208,3 ккал/моль) і каемферола (213,1 ккал/моль) (табл. 3.12).

Таблиця 3.12

Ентальпія дисоціації протона 2,3-дигідро-3,5-дигідрокси-6-метил-4 (H)-піран-4-ону в порівнянні з різними флавоноїдами

№	Сполука	PDE (5-OH), ккал/моль
1	Морін	210,9 [219]
2	Галангін	208,3 [153]
3	Каемферол	213,10 [153]
4	DDMP	209,4

Примітка. Розрахунок BDE проводили в умовах вакууму при 298 K° відповідно до теорії B3LYP/6-311++g (2d, 2p) [153, 219].

Проаналізувавши шлях інактивації АФК за участю 2,3-дигідро-3,5-дигідрокси-6-метил-4 (Н)-піран-4-ону, встановлено, що домінантними антиоксидантними механізмами для цього з'єднання є SET і SET-PT. Відповідно, DDMР входить в групу антиоксидантів середньої сили.

3.2. Антиоксидантний вплив наноккомпозитного комплексного бактеріального препарату Азогран на ріст і розвиток ячменю

На першому етапі роботи експериментальним шляхом підбирали параметри перекисного стресу. Перекис водню є природним метаболітом клітин і утворюється при дисмутації супероксидного аніон радикалу і при окисленні різних відновлених клітинних компонентів (залізо-сірковмісні протеїни, флавопротеїни). Однак H_2O_2 може накопичуватися в надлишку в клітинах прокаріотів і еукаріотів і виступати одним з найбільш агресивних промоторів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), а також сприяти розвитку оксидативного стресу. Цей стрес-агент активізує лізис клітинних мембран, який в свою чергу супроводжується зниженням життєздатності клітин і зумовлює некроз в цілому, а також виступає фактором аномального онтогенезу [8, 74, 288].

Показано, що 6% перекис водню не був агресивним оксидантом і, відповідно, не інгібував схожості насіння, а навпаки підвищувала її (табл.3.13). З літературних джерел відомо [23], що розбавлені водні розчини H_2O_2 застосовуються в якості екологічно безпечного стимулятора росту і дезинфікатора для овочевих і зернових культур. Однак при дії 20% і 33% H_2O_2 значення цього показника істотно знижувалися (табл.3.13). Особливо вираженим розвиток оксидативного стресу був при дії 33% перекису водню. Зокрема, при інкубації насіння ячменю сорту Віраж в 33% H_2O_2 їх всхожість знижувалася на 31,7%, сорту Бурхант – на 66,9% і сорту Копленд – на 41,2%, по відношенню до контролю (табл.3.13). Протягом онтогенезу рослини піддаються впливу умов навколишнього середовища, до яких вони змушені адаптуватися, розвиваючи протекторні механізми для зниження рівня їх

негативного впливу і збереження життєвого потенціалу [38]. Однак реалізація таких механізмів супроводжується значними енергетичними затратами, а це в свою чергу призводить до зниження продуктивності [80].

Таблиця 3.13

Вплив різних концентрацій перекису водню на всхожість насіння різних сортів ячменю

Насіння ячменю, сорт	Всхожість насіння (%) при дії різних концентрацій H_2O_2			
	Контроль	6%	20%	33%
Віраж	$50,4 \pm 1,1$	$186,5 \pm 0,9^{**}$	$36,1 \pm 1,8^{***}$	$18,7 \pm 0,2^{***}$
Бурхант	$75,6 \pm 0,6$	$98,1 \pm 0,5^*$	$56,1 \pm 2,0^*$	$8,7 \pm 0,5^{**}$
Копленд	$68,0 \pm 1,4$	$99,4 \pm 1,1^*$	$65,6 \pm 1,6$	$26,8 \pm 1,2^*$

Примітки: 1. контроль - насіння, оброблені стерильною дистильованою водою; 2. час обробки перекисом водню становило 25 хв.

До числа відповідей рослин на вплив різних стрес-факторів відносяться взаємовигідні зв'язки рослин з ризосферними мікроорганізмами, які здатні синтезувати широкий спектр метаболітів-антиоксидантів [81]. Такі ґрунтові мікроби становлять інтерес в створенні біологічних засобів захисту рослин, оскільки їм властиво формування тривалого захисту макроорганізму від стресових факторів навколишнього середовища [267].

Згідно з отриманими результатами дослідів в теплиці встановлено, що пост-обробка нанокомпозитним комплексним бактеріальним препаратом стресованих перекисом водню насіння ярого ячменю сортів Віраж, Бурхант і Копленд істотно стимулювала ріст рослин на різних стадіях розвитку (рис. 3.5; 3.6; 3.7). Так, на стадії кущіння висота рослин ячменю сорту Віраж у варіанті передпосівної обробки насіння 33% H_2O_2 + Азогран підвищувалася на 20,5%, сорту Копленд – на 9,6%, в порівнянні з варіантом, де на насіння діяв стрес-агент (рис. 3.5; 3.7). Однак для сорту Бурхант не спостерігали стимуляції досліджуваного показника (рис. 3.6).

Фаза кушіння дуже важливий етап органогенезу, на якому закладаються і формуються регенеративні органи. Від їх нормального розвитку залежить майбутній урожай. Крім того, в цій фазі розвитку молоді рослини сильно потребують в азотному і фосфорному харчуванні [67]. В усуненні цієї проблеми можуть брати участь високоефективні азотфіксуючі і фосфатмобілізуючі мікроорганізми, зокрема бактерії-компоненти біопрепарату Азогран [50, 78].

Аналіз даних по висоті рослин ячменю в фазі виходу в трубку (стеблування) для варіанту із застосуванням перекису водню і препарату Азогран показав також підвищення даного показника. Відповідно, для сорту Віраж – на 16,7%, для сорту Бурхант – на 10,4% і для сорту Копленд – на 7,7%, в порівнянні варіантом, де рослини розвивалися з насіння, обробленого 33% розчином H_2O_2 (рис. 3.5; 3.6; 3.7). Слід відзначити, що рослини ячменю сорту Копленд на наступних стадіях не розвивалися. Імовірно це могло бути пов'язано з тепличними умовами, які, можливо, були оптимальними для вирощування цього сорту. Відповідно, подальші дослідження проводили на 2-х сортах ячменю: Віраж і Бурхант.

У фазах цвітіння – воскова стиглість відмінності в висоті рослин ячменю між варіантами обробки посівного матеріалу 33% H_2O_2 і 33% H_2O_2 + Азогран зберігалися. Відповідно, досліджуваний показник для ячменю сорту Віраж в період цих фаз розвитку зростав у варіанті з пост-обробки насіння наноккомпозитним комплексним бактеріальним препаратом на 14,7 – 18,6%, а для сорту Бурхант – на 7,6 – 14,7%, відповідно до варіанту, де насіння піддавалися дії 33% перекису водню (рис. 3.5; 3.6).

Примітки: H_2O – Контроль (насіння, оброблені стерильною дистильованою водою); СХ – насіння, бактеризовані наноккомпозитним комплексним бактеріальним препаратом Азогран; H_2O_2 – насіння, оброблені 33% перекисом водню; H_2O_2 + СХ – насіння, піддані дії 33% перекису водню і бактеризовані 3 мл наноккомпозитним комплексним бактеріальним

препаратом Азогран; GS – стадія росту (GS-24 – кущіння, GS-45 – вихід в трубку, GS-61 – цвітіння, GS-87 – воскова стиглість).

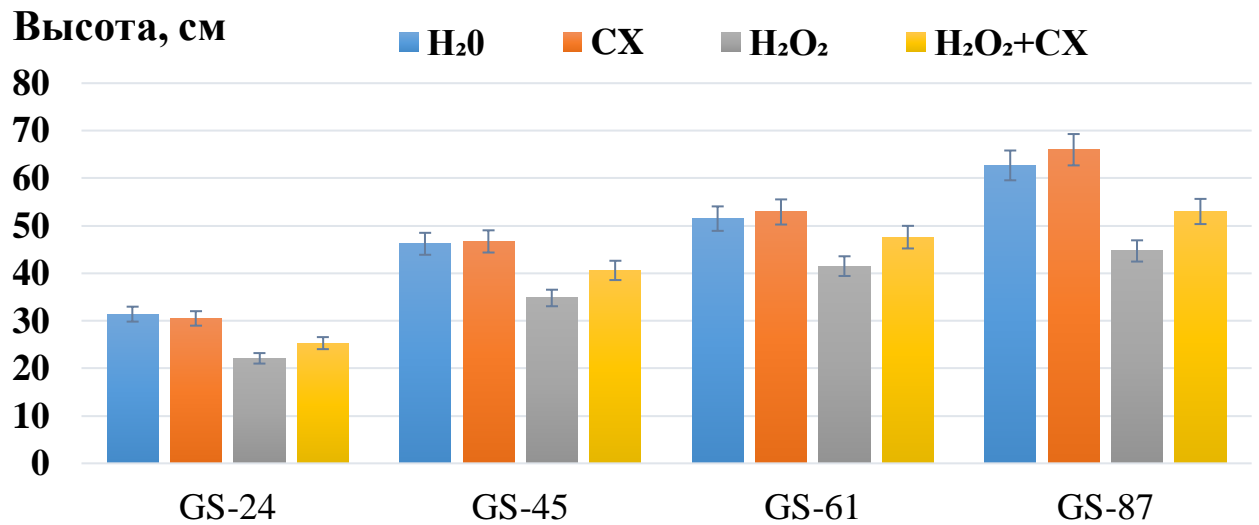


Рис. 3.5 – Вплив нанокмпозитного комплексного бактеріального препарату (CX) на висоту рослин ячменю сорту Віраж в різні фази його розвитку (GS-24,45,61,87), після обробки насіння 33% перекисом водню (H₂O₂)

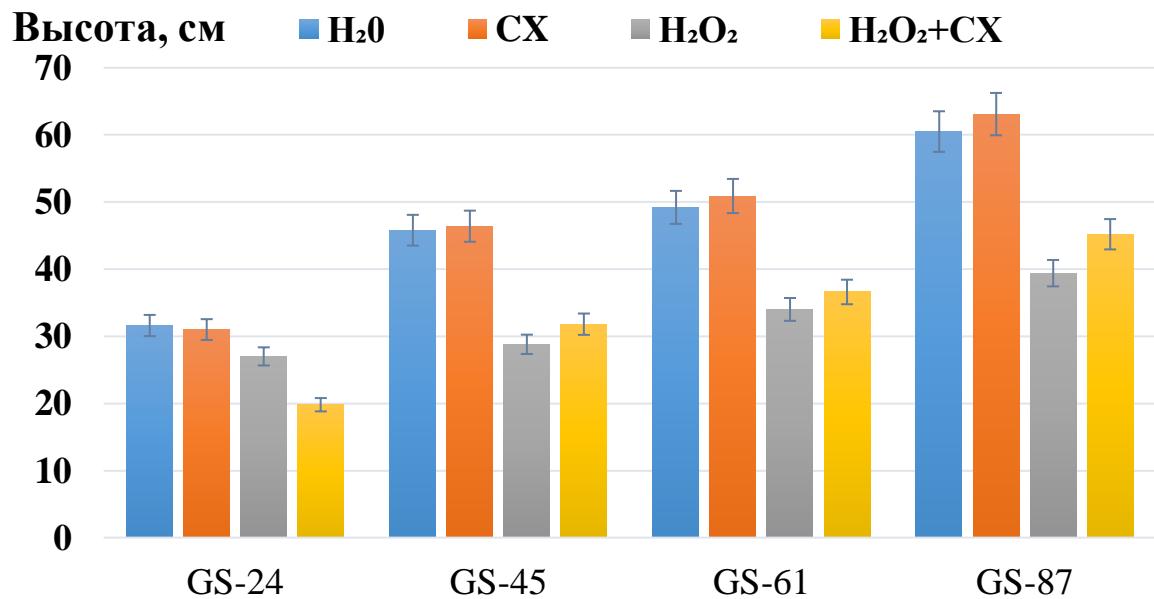


Рис. 3.6 – Вплив нанокмпозитного комплексного бактеріального препарату (CX) на висоту рослин ячменю сорту Бурхант в різні фази його розвитку (GS-24,45,61,87), після обробки насіння 33% перекисом водню (H₂O₂)

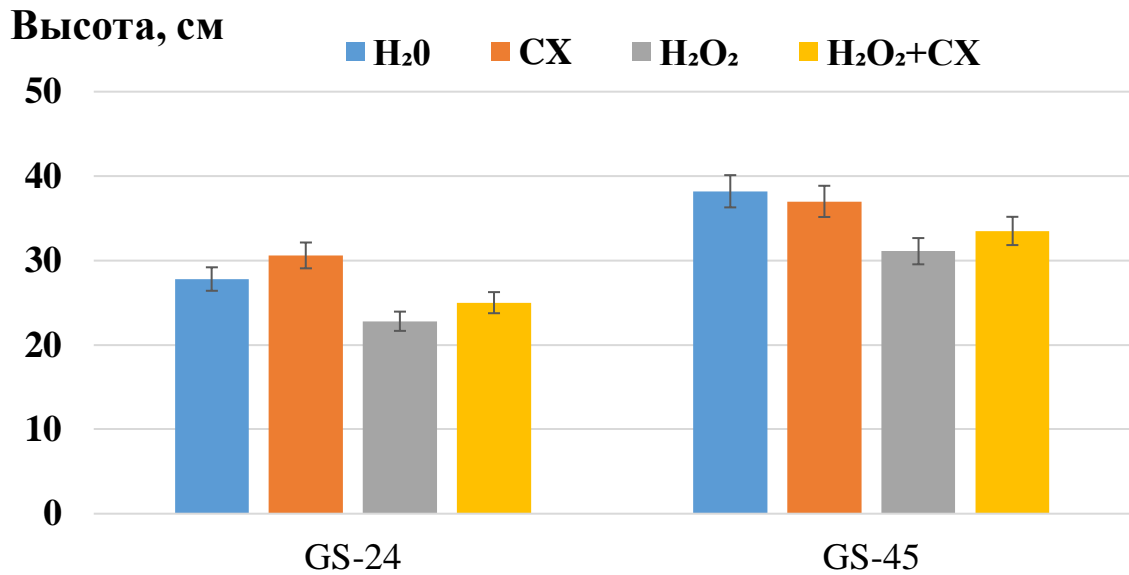


Рис. 3.7 – Вплив нанокмпозитного комплексного бактеріального препарату (CX) на висоту рослин ячменю сорту Копленд в різні фази його розвитку (GS-24,45), після обробки насіння 33% перекисом водню (H₂O₂)

Число зерен в колосі має велике значення при відборі сортів рослин по їх продуктивності і є передумовою високого врожаю. Даний показник визначається як генетичними особливостями сорту, так і умовами середовища, в яких він обробляється [3]. Також кількість зерен в колосі є головним чинником його аттрагуючої здатності – активації транспорту поживних речовин до органу з найбільшою концентрацією фітогормонів-стимуляторів [116]. Показано, що післястресова обробка посівного матеріалу ячменю нанокмпозитний комплексним бактеріальним біопрепаратом Азогран супроводжувала збільшення кількості зерен в колосі для сорту Віраж – на 29.9%, а для сорту Бурхант – на 22,8%, в порівнянні з даними показником для рослин, які вирости з стресованого насіння (рис. 3.8).

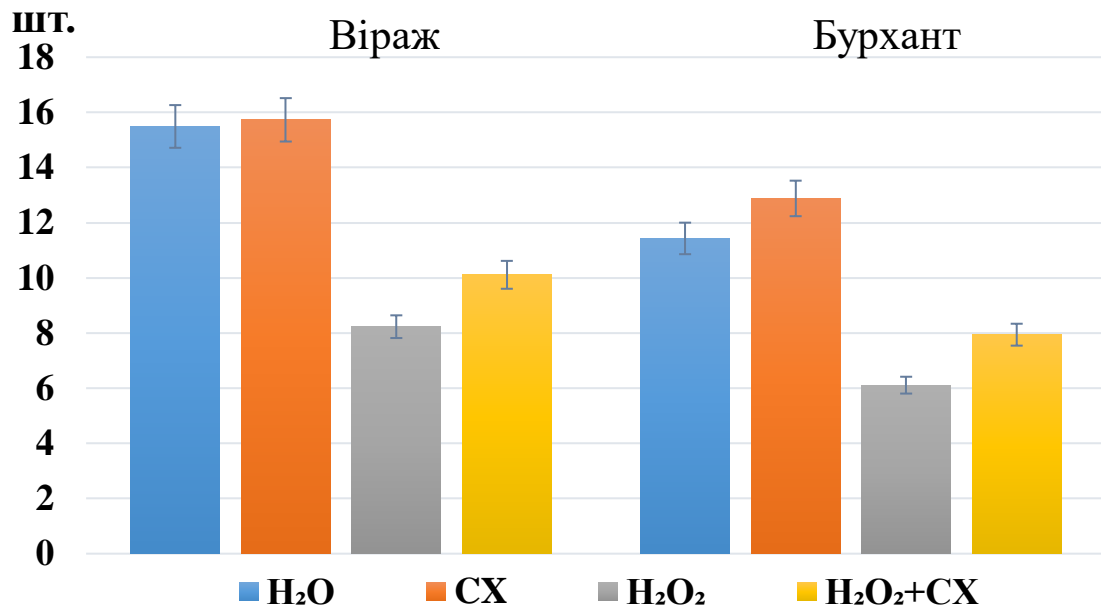


Рис. 3.8 – Вплив перекису водню (H_2O_2) і нанокompозитного комплексного бактеріального препарату (CX) на кількість зерен в колосі рослин ячменю сортів Віраж і Бурхант

Таким чином, отримані результати дозволяють зробити висновок, що інгібіторний вплив перекису водню на схожість насіння різних сортів ячменю збільшується при підвищенні концентрації цього стрес-агента. Пост-обробка нанокompозитним комплексним бактеріальним препаратом стресованих посівного матеріалу ячменю стимулювала зростання рослин на різних фазах їх розвитку, а також утворення більшої кількості зерен в колосі. Це свідчить про здатність бактерій-компонентів Азогрana синтезувати з'єднання-

антиоксиданти. Проведені дослідження дозволяють рекомендувати нанокмпозитний комплексний бактеріальний препарат, створений на основі азотфіксуючих і фосфатмобілізуєчих штамів, для підвищення стійкості рослин ячменю до збільшення вмісту в клітинах перекису водню, як стрес-агента.

3.3. Ефекти впливу абіотичного стрес-агенту і комплексного нанокмпозитного біопрепарату Азогран на вміст фенольних сполук у рослинах ячменю

Ячмінь – одна з небагатьох злакових культур, яка обробляється в країнах з різко відмінними кліматичними умовами [85, 323]. Культура представляє інтерес завдяки широкому спектру біологічно активних речовин з терапевтичним ефектом на стан організму людини і тварин [97, 196, 332]. Особливий інтерес представляють сполуки фенольної природи, вміст яких в ячмені значно вище, ніж в інших зернових [128, 277, 279]. Якісний і кількісний вміст Ph-ОН в ячмені залежить від сортових особливостей [115, 226], локації вирощування, умов навколишнього середовища [134, 322] і періоду культивування [143]. Більшість фенольних сполук в рослинах знаходяться у вільній і зв'язаній формах [140, 322]. В теперешній час в літературі в основному описані вільні Ph-ОН і практично нічого не відомо про зв'язані сполуки цієї групи. В цілому, експериментальні дані, що стосуються детального дослідження фенольних речовин ячменю, відсутні.

У таких країнах як Україна ячмінь сортів Віраж, Монголія – Бурхант, Канада – Копленд широко використовуються у виробництві та споживанні, тому вони мають високу дослідницьку цінність. Фенольні речовини в рослинах цих сортів ячменю раніше не вивчалися. Відповідно, мета дослідження полягала в порівнянні відмінностей в складі і вмісті Ph-ОН у різних сортів ячменю, насіння яких піддавали дії стрес-агенту – перексиду водню і пост-обробці нанокмпозитним комплексним бактеріальним препаратом Азогран. Виявлено, що обробка насіння різних сортів ячменю

стрес-агентом і подальша їх пост-обробка Азограном істотно впливали на відмінності в вмісті вільних і зв'язаних фенольних сполук.

У варіанті з обробкою посівного матеріалу дистильованою стерильною водою ідентифіковані 4-гідроксифенілоцтова, хлорогенова, кавова, сірінгова, бензойна, п-кумарова, транс-ферулова, сінапова і транс-корична кислоти. Найбільш високий їх вміст спостерігали у вільній фракції фенольних сполук, отриманій з рослин ячменю сорту Копленд – 744,131 мкг/мл (рис. 3.9; табл. 3.14). У рослинах двох інших сортів ячменю істотних відмінностей в кількісному складі не виявлено (табл. 3.14).

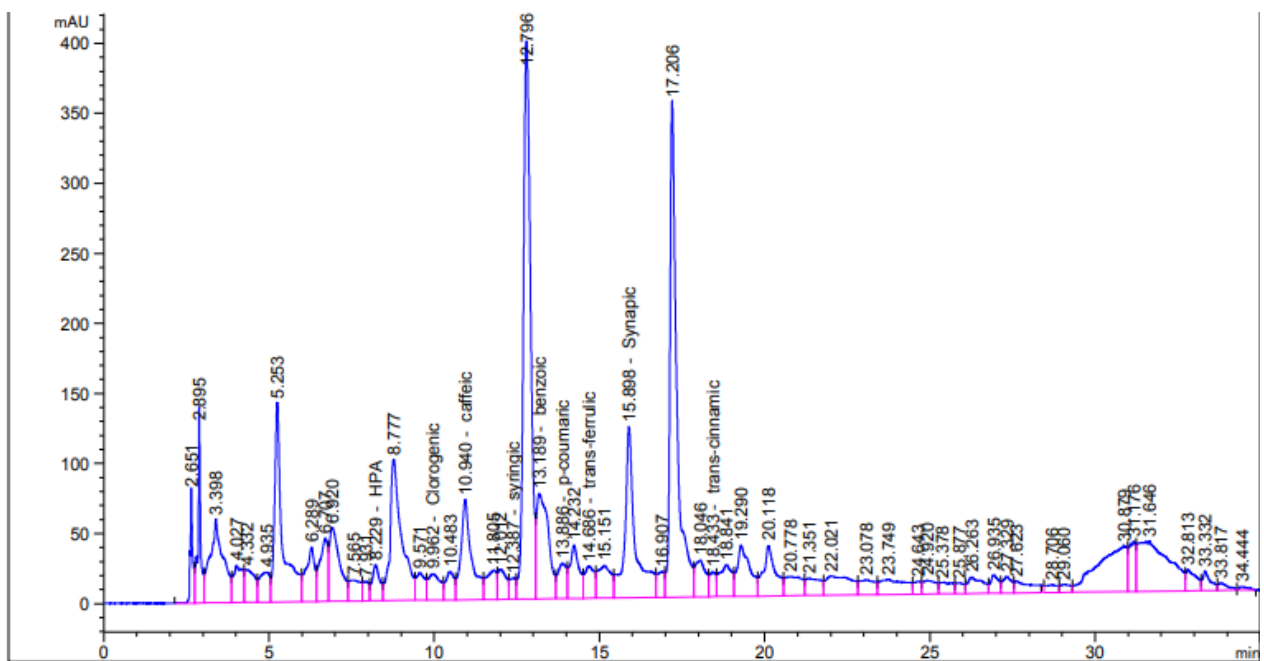


Рис. 3.9 – ВЕРХ-аналіз вмісту фенольних кислот в метанольному екстракті рослин ячменю сорту Копленд при обробці насіння стерильною дистильованою водою (вільна фракція фенольних сполук)

При обробці насіння нанокомпозитним комплексним бактеріальним препаратом Азогран значне збільшення концентрації фенольних кислот (вільна фракція) було в рослинах ячменю сорту Віраж – 930,026 мкг/мл. Щодо інших сортів, кількісний склад цих речовин дещо знижався в порівнянні з контролем ($H_2O_{\text{дист.}}$). Слід також зазначити, що якісний склад

фенолкарбонових кислот, як в цьому варіанті, так і в попередньому був однаковим (табл. 3.14).

Дія агресивного стрес-агенту – перекису водню на посівний матеріал інгібувала синтез вільної фракції фенольних кислот в рослинах сорту Бурхант на 268,831 мкг/мл і сорти Копленд – на 86,487 мкг/мл, тоді як для сорту Віраж цей показник практично не змінювався в порівнянні з варіантом обробки насіння всіх сортів Азограном. Також було встановлено, що сірінгова кислота в метанольних екстрактах, отриманих з рослин ячменю сортів Бурхант і Віраж, не ідентифікувалася (рис. 3.10; 3.11; табл. 3.14).

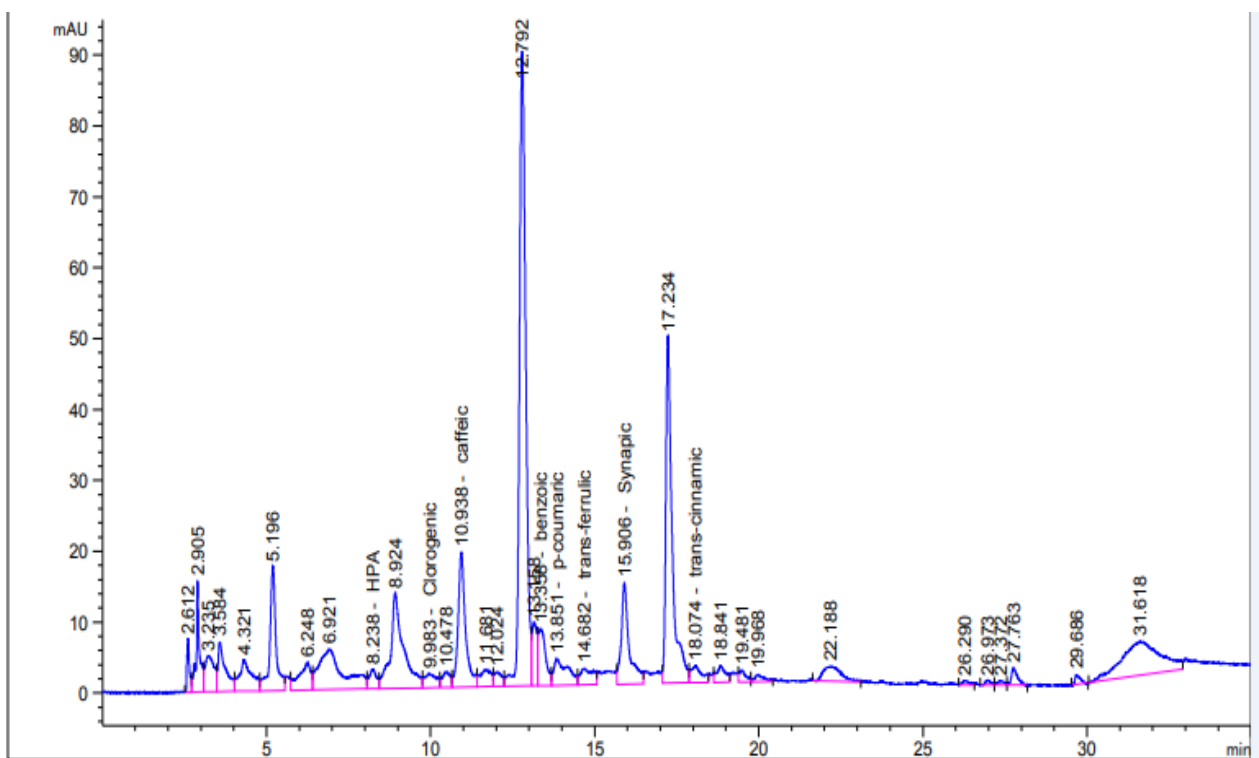


Рис. 3.10 – ВЕРХ-аналіз вмісту фенольних кислот в метанольному екстракті рослин ячменю сорту Бурхант при обробці насіння стрес-агентом – пероксидом водню (вільна фракція фенольних сполук)

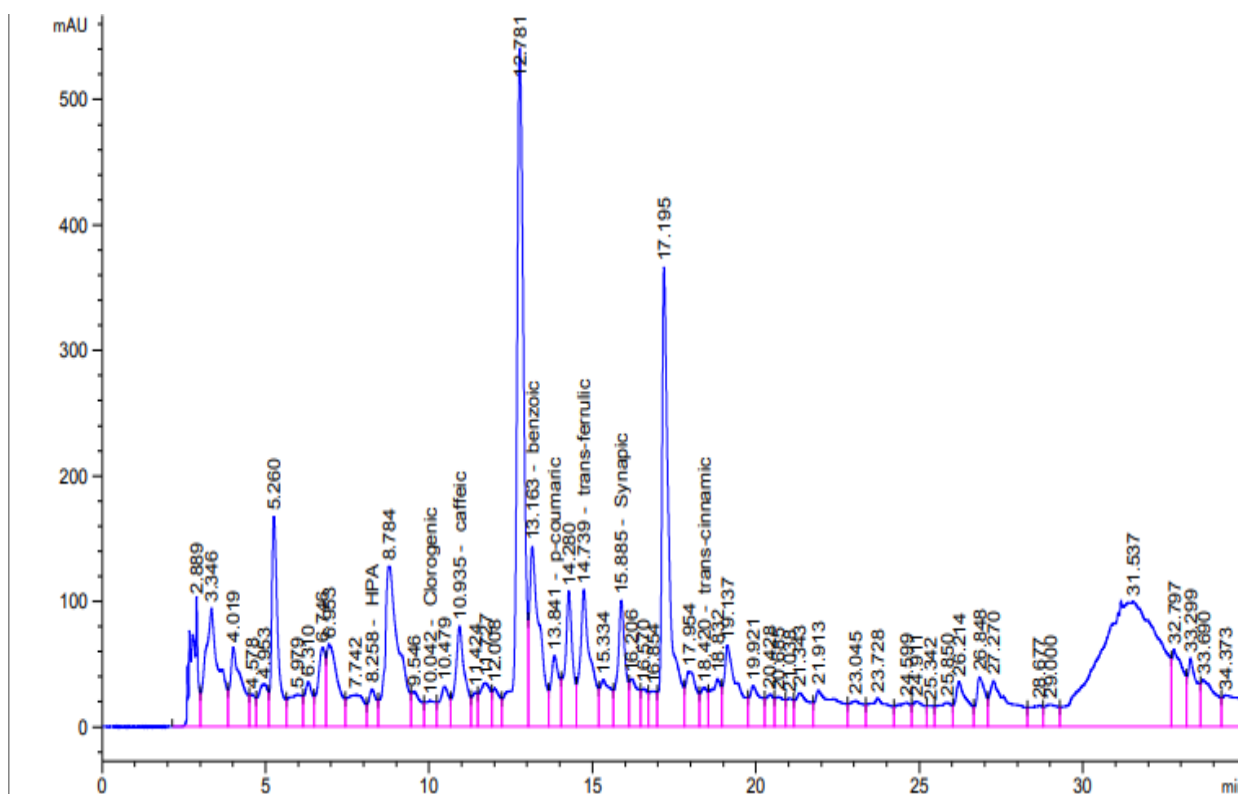


Рис. 3.11 – ВЕРХ-аналіз вмісту фенольних кислот в метанольному екстракті рослин ячменю сорту Віраж при обробці насіння стрес-агентом – пероксидом водню (вільна фракція фенольних сполук)

У варіанті з пост-обробкою Азограном насіння досліджуваної злакової культури концентрація вільних фенольних кислот підвищувалася тільки в рослинах ячменю сорту Бурхант на 13,632 мкг/мл, в порівнянні з кількісним складом Ph-ОН в стресованих рослинах цього ж сорту. Однак, для двох інших сортів ячменю стимулюючого ефекту біопрепарату на вміст фенолкарбонових кислот вільної фракції в їх рослинах не виявлено. При цьому в якісному складі були присутні всі фенолкарбонові кислоти, зокрема сірінговая кислота, концентрація якої була вище, ніж в контролі, на 9,77 мкг/мл, відповідно (табл. 3.14).

Галова кислота не була виявлена ні в одній вільній фракції фенольних кислот метанольних екстрактів рослин різних сортів ячменю.

Таблиця 3.14

Вміст фенолкарбонових кислот у вільній фракції метанольних екстрактів рослин різних сортів ячменю

Варіант обробки	Сорт ячменю	Фенолкарбонові кислоти, (мкг/мл)										
		Галова	4-ГФОК	Хлорогенова	Камова	Сірінгова	Бензойна	n-Кумарова	транс- Ферулова	Сінапова	транс- Корична	Загальний вміст, Σ
dH ₂ O (контроль)	Бурхант	-	15.04	90.06	121.88	7.51	78.07	17.59	25.11	79.2	8.80	443.302
	Віраж	-	19.6	64.9	104.21	10.39	87.73	18.96	48.02	78.02	5.36	439.224
	Копленд	-	33.32	178.49	180.57	11.39	130.43	31.79	30.1	142.14	5.86	744.131
СХ	Бурхант	-	13.7	83.76	91.37	6.62	68.17	15.75	13.08	66.56	3.11	362.156
	Віраж	-	44.03	167.95	227.12	22.48	196.4	62.61	43.78	154.4	11.09	930.026
	Копленд	-	28.38	152.25	205.74	12.39	74.99	31.45	61.28	144.38	5.42	716.309
H ₂ O ₂	Бурхант	-	3.60	20.72	34.12	-	8.57	7.58	4.44	12.83	1.42	93.325
	Віраж	-	41.09	174.39	187.06	-	214.30	68.11	158.20	88.15	11.63	943.040
	Копленд	-	28.26	158.97	157.82	13.29	72.16	39.98	26.97	113.24	19.09	629.822
H ₂ O ₂ + СХ	Бурхант	-	4.42	27.58	28.72	2.50	10.65	9.34	4.24	17.2	2.25	106.957
	Віраж	-	41.21	169.65	197.81	20.16	189.60	55.61	34.62	86.63	10.38	805.787
	Копленд	-	32.51	158.27	141.68	12.21	60.29	35.01	48.53	85.57	16.95	591.071

Якісний і кількісний вміст фенолкарбонових кислот в зв'язаній фракції метанольних екстрактів рослин різних сортів ячменю значно відрізнявся від їх наявності у вільній фракції і залежало від варіанту обробки посівного матеріалу.

Виявлено, що в зв'язаній фракції фенольних сполук, отриманій з рослин ячменю сорту Бурхант, насіння якого замочували в дистильованій стерильній воді, містяться сірінгова, бензойна, п-кумарова, транс-ферулова, сінапова і транс-корична кислоти (табл. 3.15). Тоді як в рослинах ячменю сорту Віраж крім цих фенольних кислот, виявлена ще 4-ГФОК і кавова, однак сірінгова була відсутня. Кількісний вміст кожної з фенольних кислот був найбільш високим у порівнянні з двома іншими сортами (рис. 3.12; табл. 3.15). В зв'язаній фракції фенольних кислот рослин сорту Копленд були присутні всі фенолкарбонові кислоти, крім галової (рис. 3.13; табл. 3.15).

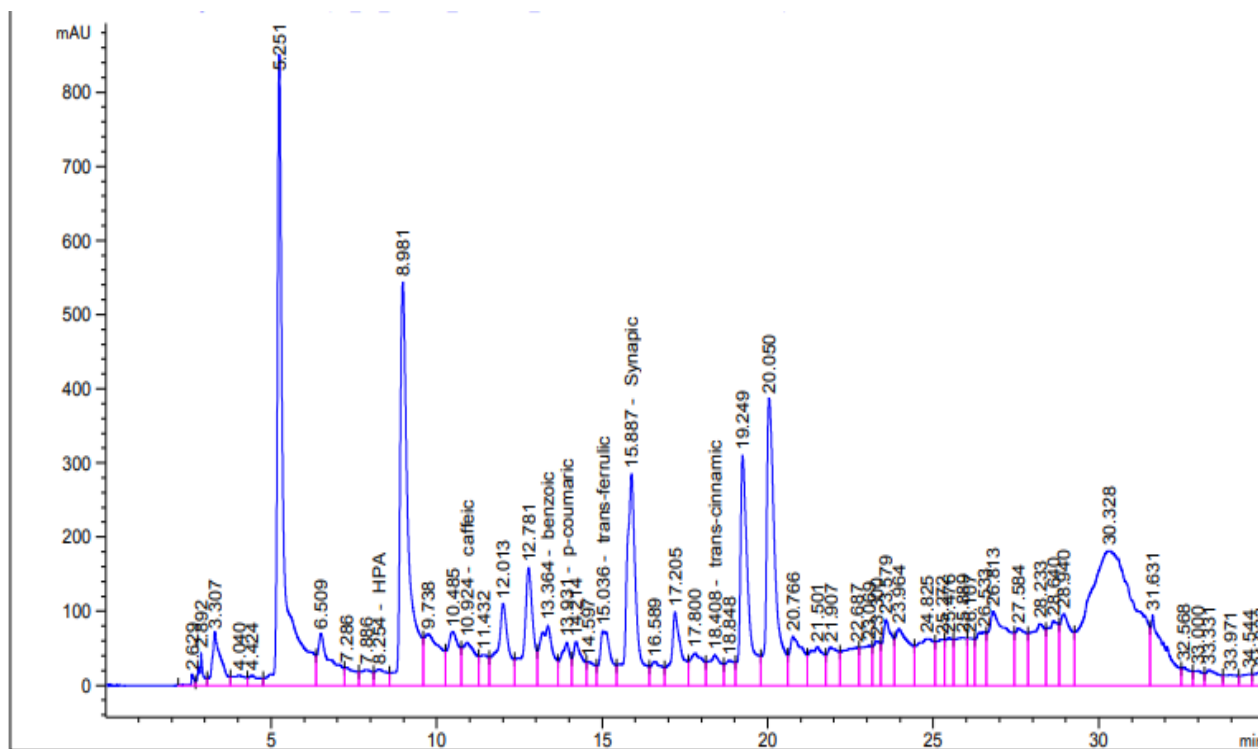


Рис. 3.12 – ВЕРХ-аналіз вмісту фенольних кислот в метанольному екстракті рослин ячменю сорту Віраж при обробці насіння стерильною дистильованою водою (пов'язана фракція фенольних сполук)

Обробка посівного матеріалу 33% перексидом водню негативно впливала як на якісний, так і на кількісний склад фенолкарбонових кислот зв'язаної фракції, отриманої з рослин 3-х досліджуваних сортів ячменю. Зокрема, в рослинах ячменю сорту Бурхант концентрація бензойної кислоти знижувалася на 64,13 мкг/мл, п-кумарової – на 19,16 мкг/мл, транс-ферулової – на 48,62 мкг/мл, сінапової – на 67,67 мкг/мл, в порівнянні з контролем. У рослинах сорту Віраж вміст кавової кислоти знижувався на 66,21 мкг/мл, бензойної – на 29,50 мкг/мл і сінапової – на 17,70 мкг/мл по відношенню до контрольного зразку (табл. 3.15). У рослинах сорту Копленд концентрація кавової кислоти знижувалася на 38,09 мкг/мл, бензойної – на 32,35 мкг/мл, п-кумарової – на 16,04 мкг/мл, транс-ферулової – 36,81 мкг/мл, сінапової – на 46,22 мкг/мл і транс-коричної – на 9,75 мкг/мл, в порівнянні з контролем. Також для цього сорту не ідентифікувалась 4-ГФОК, хлорогенова і сірінгова кислоти (рис. 3.14; табл. 3.15).

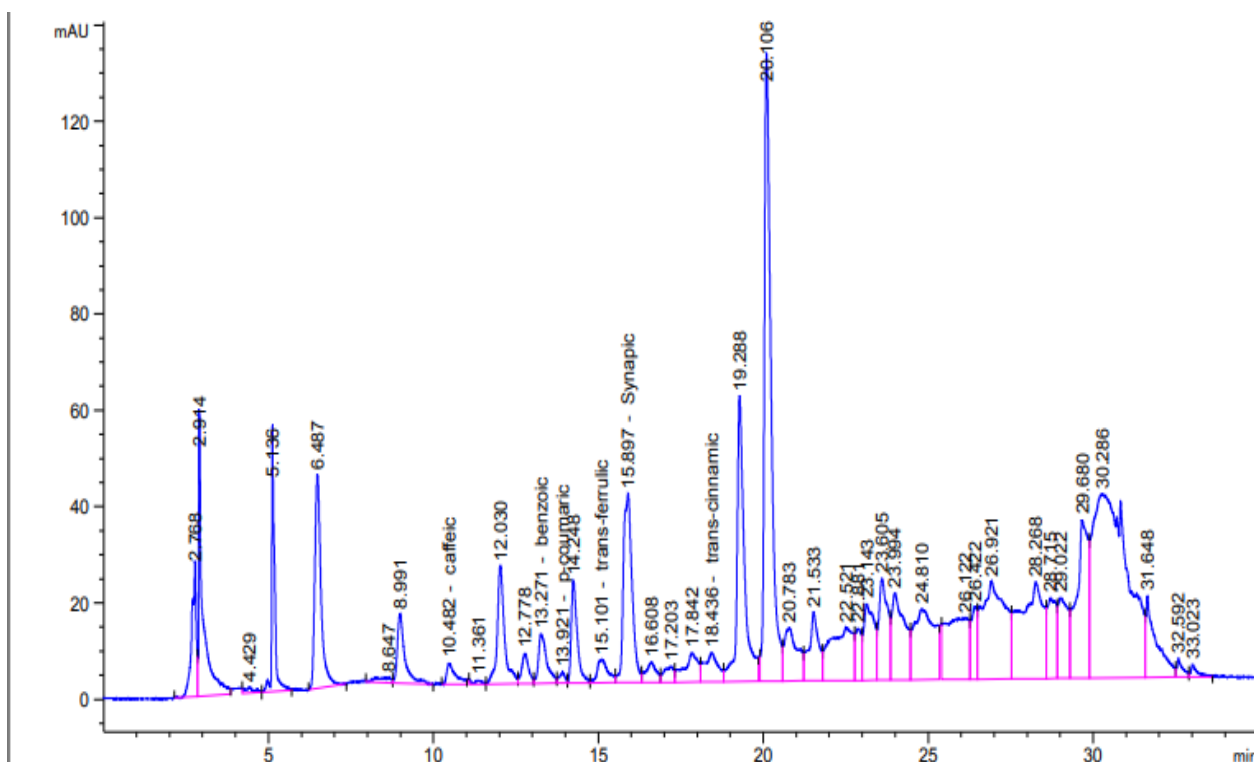


Рис. 3.14 – ВЕРХ-аналіз вмісту фенольних кислот в метанольному екстракті рослин ячменю сорту Копленд при обробці насіння стрес-агентом – перексидом водню (зв'язана фракція фенольних сполук)

Пост-обробка наноккомпозитним комплексним бактеріальним препаратом Азогран насіння різних сортів ячменю викликала підвищення рівня деяких фенолкарбонових кислот в стресованих рослинах тільки двох сортів цієї злакової культури. Відповідно, в зв'язаній фракції цих сполук, отриманій з рослин ячменю сорту Бурхант, зростала концентрація хлорогенової і бензойної кислот на 34,69 мкг/мл і 27,46 мкг/мл, в порівнянні з рослинами, насіння яких обробляли перексидом водню (табл. 3.15).

У такій же фракції з рослин сорту Віраж збільшувалася тільки концентрація транс-ферулової кислоти на 36,30 мкг/мл, в порівнянні з варіантом, де був присутній тільки стрес-агент (табл. 3.15). Істотних змін у вмісті фенольних кислот в зв'язаній фракції, отриманої з рослин сорту Копленд, не виявлено.

У рослинах досліджуваних сортів ячменю, насіння яких піддавали різній обробці, визначали вміст флавоноїдів у вільній і зв'язаній фракціях. В результаті виявлено суттєві відмінності.

Вільна фракція флавоноїдів, екстрагована з рослин ячменю сорту Бурхант (контрольний варіант) містила рутин, кверцетин-3- β -глікозид, кверцетин і лютеолін (рис. 3.15; табл. 3.16). У такій же фракції з рослин ячменю сорту Віраж крім вище зазначених, крім рутина, ідентифіковано неогесперидін. Загальна кількість цих сполук мала найбільш високий показник, який становив 15,367 мкг/мл (рис. 3.16; табл. 3.16). У рослинах сорту Копленд виявлені тільки 2 флавоноїди – кверцетин-3- β -глікозид і кверцетин (рис. 3.17; табл. 3.16).

Таблиця 3.15

Вміст фенолкарбонових кислот в зв'язаній фракції метанольних екстрактів рослин різних сортів ячменю

Варіант обробки	Сорт ячменю	Фенолкарбонові кислоти, (мкг/мл)									
		Галова	4-ГФОК	Хлорогенова	Кавова	Сірінгова	Бензойна	<i>n</i> -Кумарова	<i>транс</i> - Феруловаа	Сінапова	<i>транс</i> - Корична
dH ₂ O (контроль)	Бурхант	-	-	-	-	18.04	74.93	23.37	54.41	87.89	6.46
	Віраж	-	44.19	-	173.43	-	151.60	74.62	111.80	290.90	26.98
	Копленд	-	16.58	35.87	47.95	10.32	44.81	17.77	44.15	84.29	13.98
СХ	Бурхант	3.6	-	-	44.94	5.77	34.86	12.56	31.49	50.18	4.91
	Віраж	-	54.31	-	119.91	-	132.2	74.38	107.90	274.5	28.80
	Копленд	-	1.12	-	5.98	1.54	15.38	2.28	6.21	24.83	3.21
H ₂ O ₂	Бурхант	-	-	10.64	9.97	19.91	10.80	4.21	5.79	18.22	2.94
	Віраж	-	54.85	-	107.22	97.22	122.10	67.89	107.90	273.20	26.42
	Копленд	-	-	-	9.86	-	12.46	1.73	7.34	38.07	4.23
H ₂ O ₂ + СХ	Бурхант	-	-	45.33	-	-	38.26	2.11	1.59	4.77	-
	Віраж	-	30.05	-	92.3	-	114.7	59.45	144.20	274.5	27.37
	Копленд	-	-	-	8.91	6.15	9.58	1.19	7.07	33.66	2.36

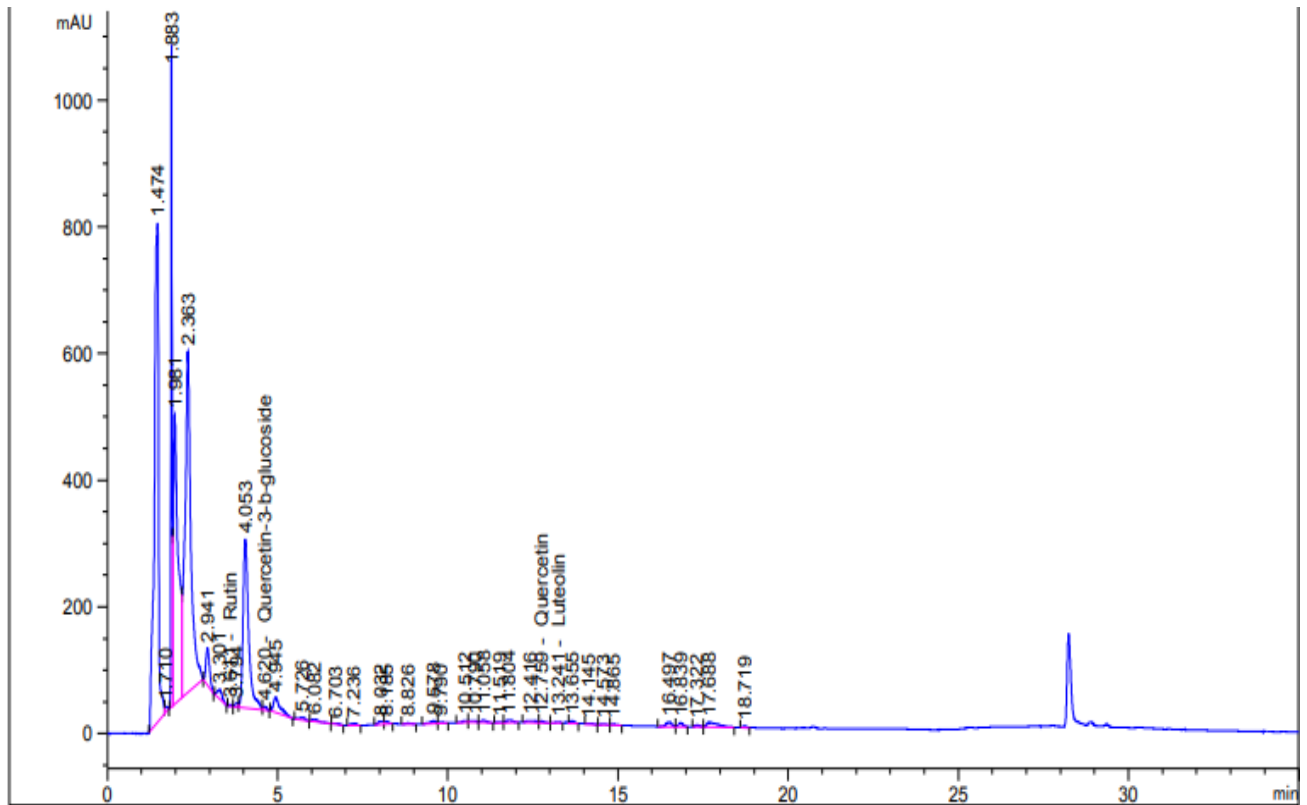


Рис. 3.15 – ВЕРХ-аналіз вмісту флавоноїдів в метанольному екстракті рослин ячменю сорту Бурхант при обробці насіння стерильною дистильованою водою (вільна фракція фенольних сполук)

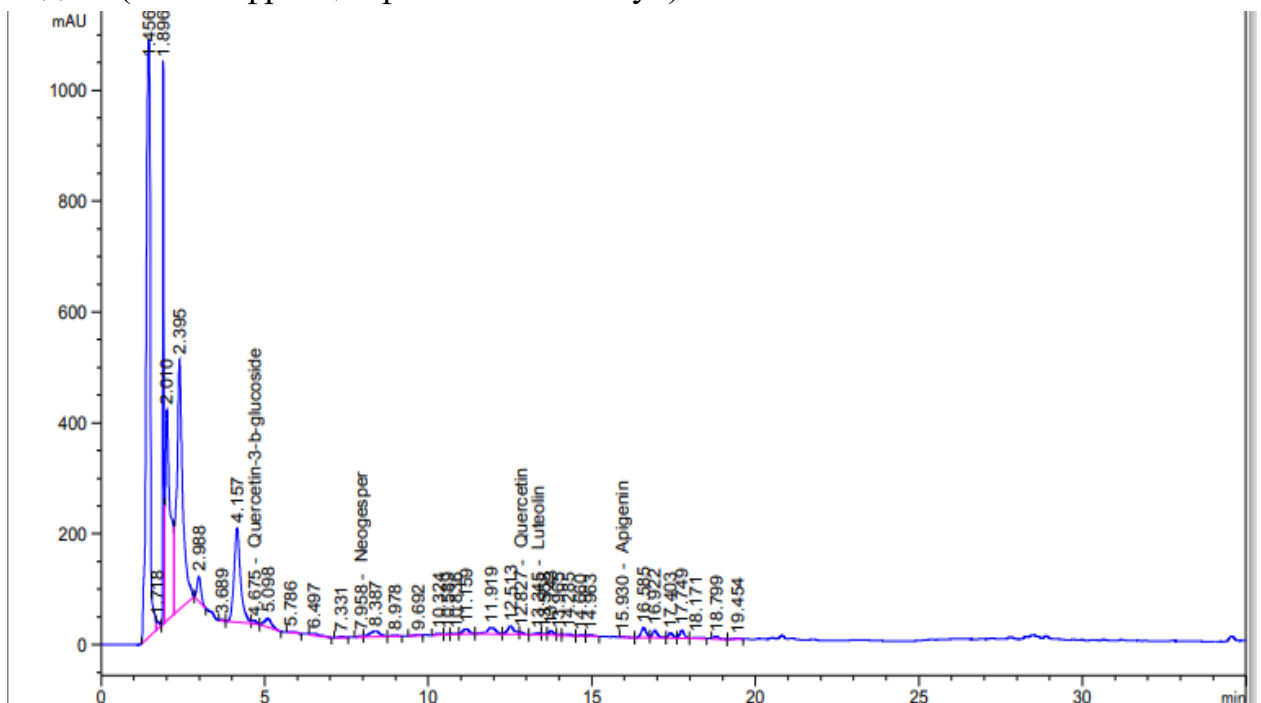
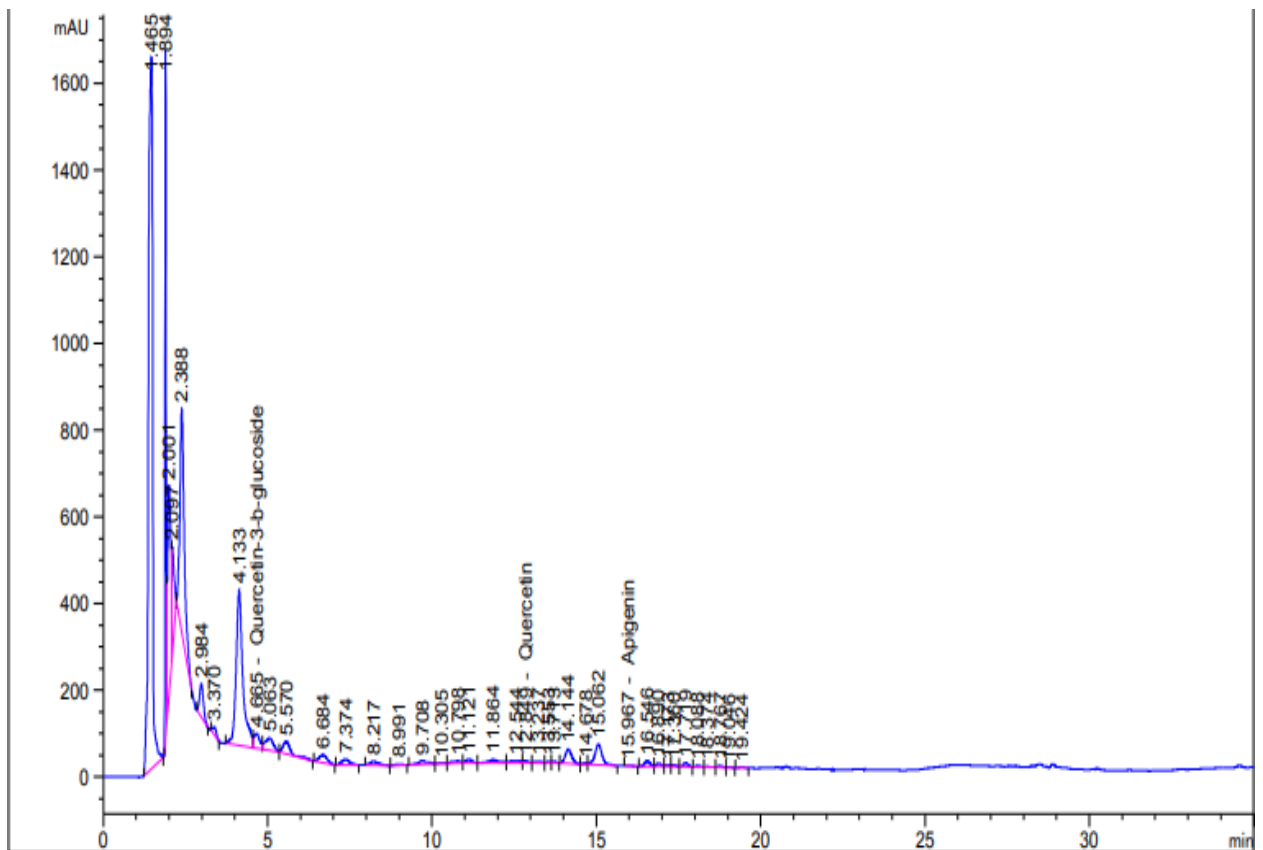


Рис. 3.16 – ВЕРХ-аналіз вмісту флавоноїдів в метанольному екстракті рослин ячменю сорту Віраж при обробці насіння стерильною дистильованою водою (вільна фракція фенольних сполук)



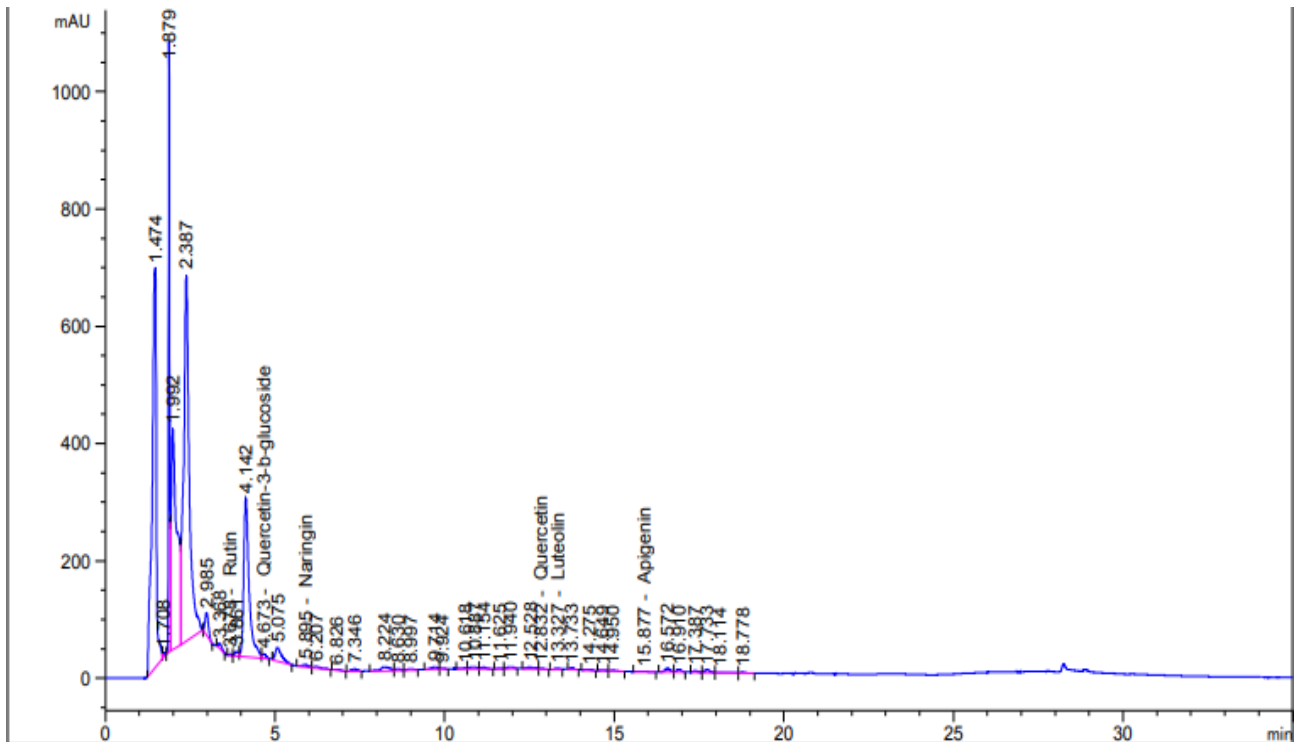


Рис. 3.18 – ВЕРХ-аналіз вмісту флавоноїдів в метанольному екстракті рослин ячменю сорту Бурхант при обробці насіння наноконпозитним комплексним бактеріальним препаратом Азогран (вільна фракція фенольних сполук)

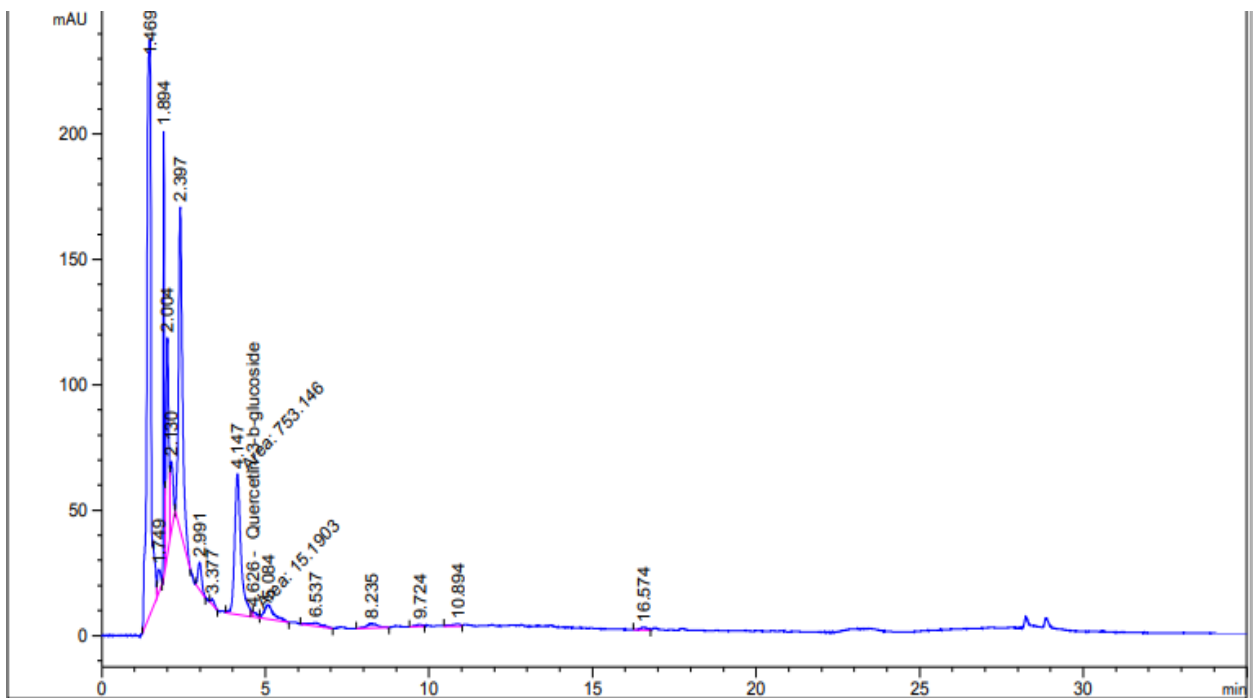


Рис. 3.19 – ВЕРХ-аналіз вмісту флавоноїдів в метанольному екстракті рослин ячменю сорту Бурхант при обробці насіння стрес-агентом – пероксидом водню (вільна фракція фенольних сполук)

Таблиця 3.16

Вміст флавоноїдів у вільній фракції метанольних екстрактів рослин різних сортів ячменю

Варіант обробки	Сорт ячменю	Флавоноїди, (мкг/мл)									
		Рутин	Кверцетин-3- β - глікозид	Нарингін	Неогесперидін	Кверцетин	Лютеолін	Нарингенин	Апигенин	Каемпферол	Загальний вміст, Σ
dH ₂ O (контроль)	Бурхант	1.665	2.344	-	-	3.683	3.385	-	-	-	11.076
	Віраж	-	2.49	-	3.19	4.603	5.074	-	-	-	15.367
	Копленд	-	5.384	-	-	4.878	-	-	-	-	10.262
СХ	Бурхант	1.659	2.501	5.527	-	2.743	3.277	-	-	-	15.707
	Віраж	1.874	3.654	-	-	7.261	8.388	-	-	-	21.178
	Копленд	-	-	-	2.76	-	4.221	-	-	-	6.988
H ₂ O ₂	Бурхант	-	2.148	-	-	-	-	-	-	-	2.148
	Віраж	2.668	3.297	-	-	7.669	9.652	-	-	-	23.287
	Копленд	-	3.004	-	-	4.039	4.225	-	-	-	11.267
H ₂ O ₂ + СХ	Бурхант	1.757	2.193	-	-	-	-	-	-	-	3.950
	Віраж	-	3.155	-	-	8.269	8.754	-	-	-	20.179
	Копленд	-	2.979	-	-	3.101	4.100	-	-	-	10.181

Вміст флавоноїдів в зв'язаній фракції, отриманої з рослин 3-х сортів ячменю, був набагато вище, ніж у вільній. Зокрема, в контрольних рослинах сортів Бурхант він досягав 102,956 мкг/мл, Віраж – 28,485 мкг/мл і Коппенд – 15,155 мкг/мл. Також для цієї фракції виявлені відмінності в якісному складі: сорт Бурхант – рутин, кверцетин-3- β -глікозид, кверцетин; сорт Віраж – кверцетин, каемпферол; сорт Коппенд – кверцетин-3- β -глікозид, кверцетин (рис. 3.20; 3.21; 3.22; табл. 3.17).

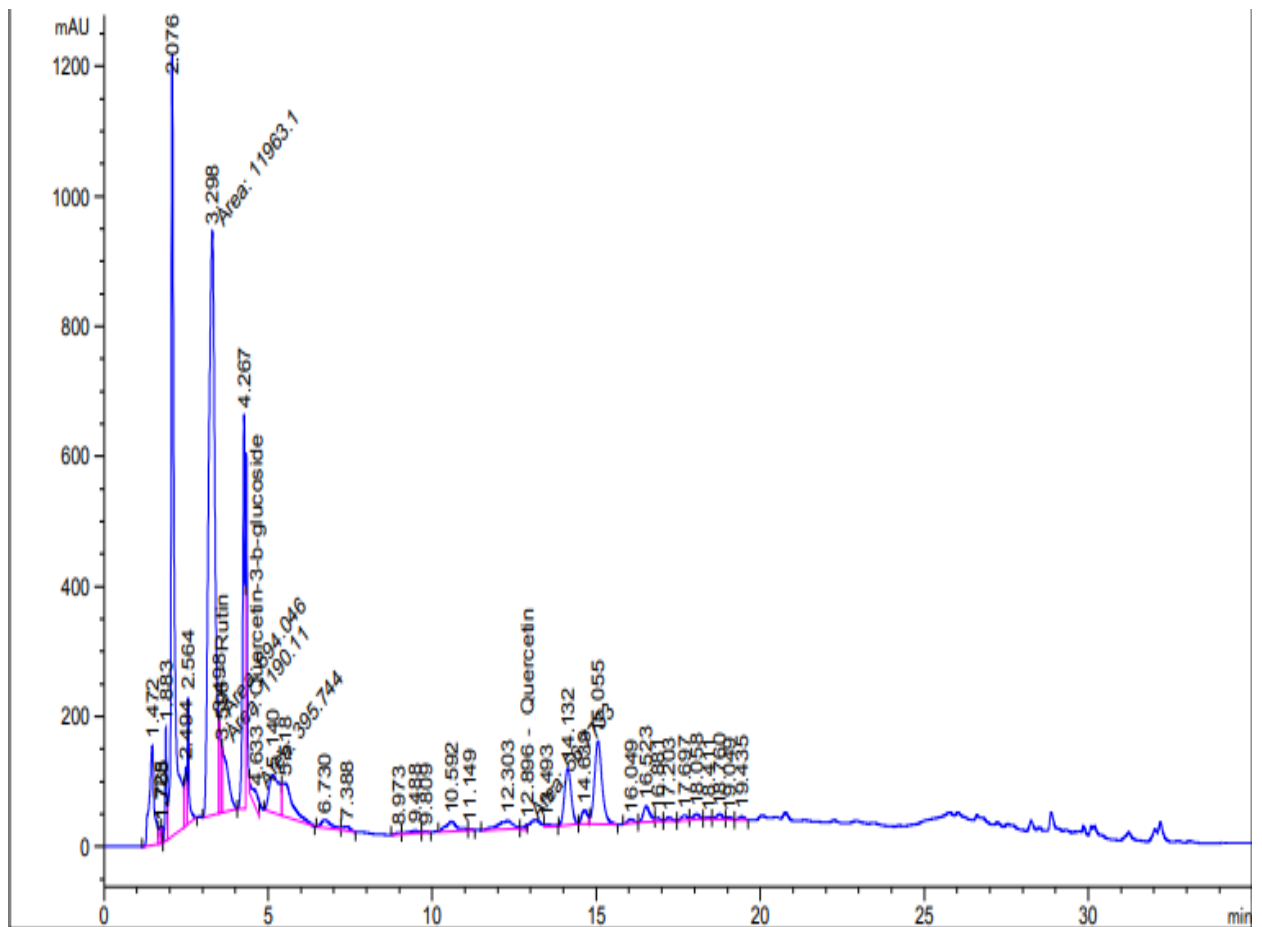


Рис. 3.20 – ВЕРХ-аналіз вмісту флавоноїдів в метанольному екстракті рослин ячменю сорту Бурхант при обробці насіння стерильною дистильованою водою (зв'язана фракція фенольних сполук)

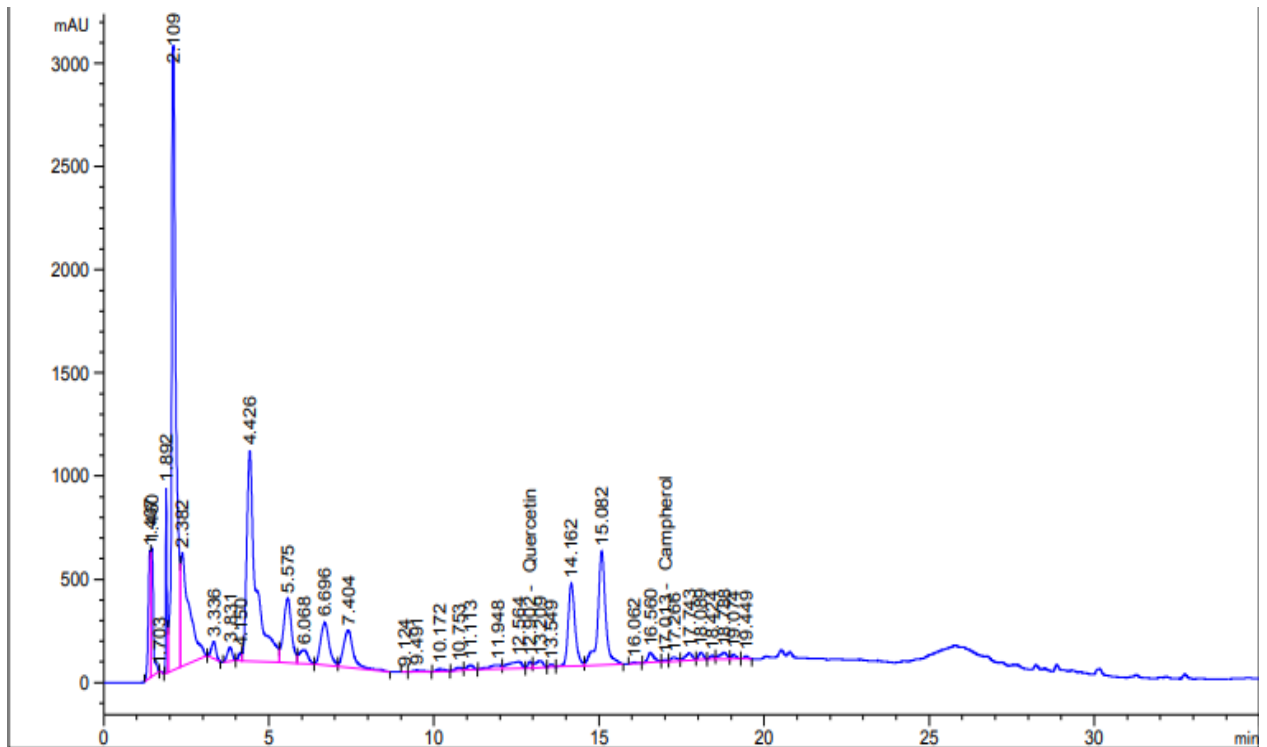


Рис. 3.21 – ВЕРХ-аналіз вмісту флавоноїдів в метанольному екстракті рослин ячменю сорту Віраж при обробці насіння стерильною дистильованою водою (зв'язана фракція фенольних сполук)

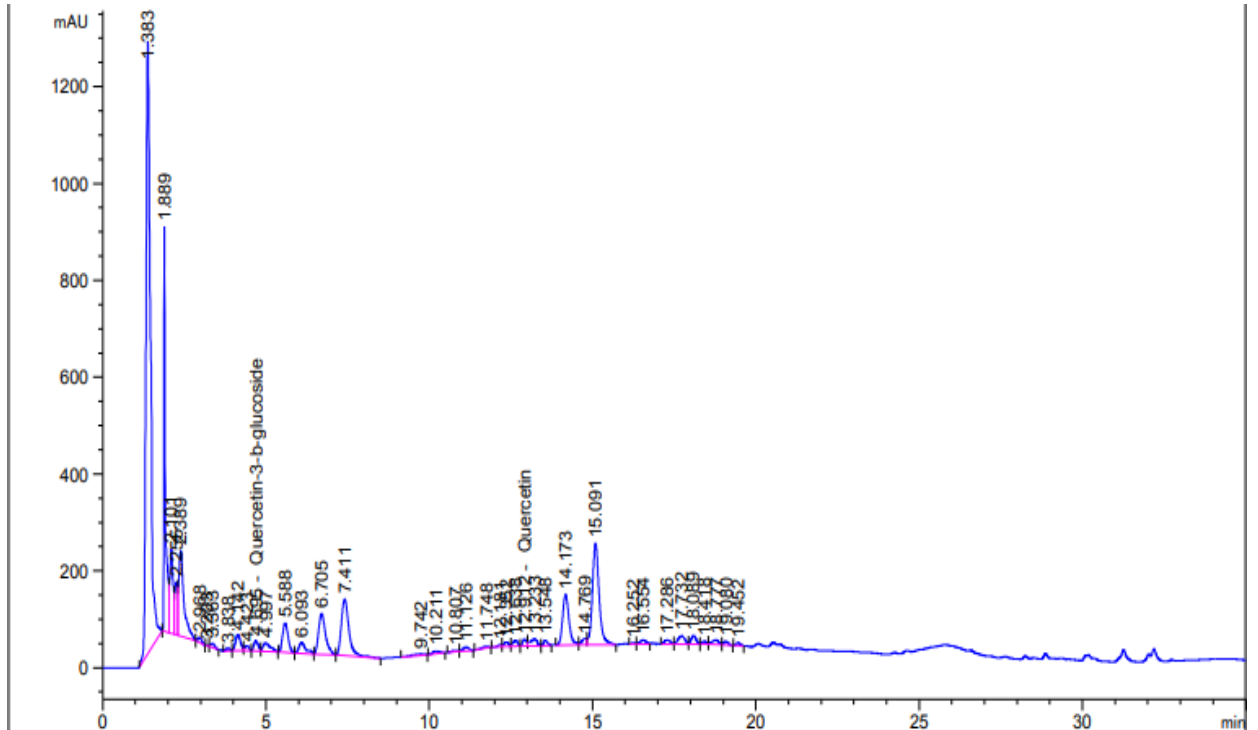


Рис. 3.22 – ВЕРХ-аналіз вмісту флавоноїдів в метанольному екстракті рослин ячменю сорту Копленд при обробці насіння стерильною дистильованою водою (зв'язана фракція фенольних сполук)

Обробка насіння нанокмпозитним комплексним бактеріальним препаратом викликала підвищенню концентрації флавоноїдів тільки в рослинах сорту Віраж, яка становила 71,547 мкг/мл. Стимулюючого ефекту Азограну на якісний і кількісний склад флавоноїдів в рослинах сортів Бурхант і Копленд не відзначено (табл. 3.17).

Дія 33% пероксиду водню на насіння досліджуваної злакової культури проявляла інгібуючу дію на синтез флавоноїдів в рослинах сорту Віраж. Відповідно їх кількість в зв'язаній фракції знижувалася на 12,625 мкг/мл, в порівнянні з рослинами, насіння яких обробляли препаратом. Крім того, обробка посівного матеріалу цим стрес-агентом стимулювала в рослинах ячменю сорту Бурхант утворення нарінгину (табл.3.17).

Пост-обробка Азограном стресованого насіння ячменю найбільш позитивно впливала на флавоноїдний комплекс зв'язаної фракції рослин сорту Віраж. У цій фракції виявлено високий вміст кверцетин-3- β -глікозиду – 21,544 мкг/мл і кверцетину – 29,584 мкг/мл, відповідно (табл. 3.17). Для 2-х інших сортів такого ефекту не спостерігалось.

Згідно з отриманими результатами, велике значення при дослідженні впливу біопрепаратів на різні рослини, зокрема і ячмінь, відіграє сортоспецефічність. Ячмінь сорти Віраж показав більш високі результати, так як він культивується на території України і є більш адаптованим. Тоді як ячмінь сортів Бурхант (Монголія) і Копленд (Канада) вперше були висажені на ґрунті України. Однак обробка насіння цих сортів біопрепаратом Азогран мала на них позитивний вплив.

Таблиця 3.17

Вміст флавоноїдів в зв'язаній фракції метанольних екстрактів рослин різних сортів ячменю

Варіант обробки	Сорт ячменю	Флавоноїди, (мкг/мл)									
		Рутин	Кверцетин-3- β - глікозид	Нарингін	Неогесперидін	Кверцетин	Лютеолін	Нарингенин	Апигенин	Каемпферол	Загальний вміст, Σ
dH ₂ O (контроль)	Бурхант	90.767	5.205	-	-	6.984	-	-	-	-	102.956
	Віраж	-	-	-	-	26.732	-	-	-	1.753	28.485
	Копленд	-	3.615	-	-	11.54	-	-	-	-	15.155
СХ	Бурхант	7.16	5.423	-	-	4.237	-	-	-	-	16.821
	Віраж	-	43.503	-	-	27.401	-	-	-	0.643	71.547
	Копленд	-	4.367	-	-	8.460	-	-	-	-	12.827
H ₂ O ₂	Бурхант	-	2.332	9.829	-	2.656	-	-	-	-	14.817
	Віраж	-	31.446	-	-	27.145	-	-	-	0.331	58.922
	Копленд	-	6.509	-	6.243	12.221	-	-	-	-	24.973
H ₂ O ₂ + СХ	Бурхант	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Віраж	-	21.544	-	-	29.584	-	-	-	0.469	51.597
	Копленд	-	5.495	-	2.303	8.041	-	-	-	-	15.839

Проведений аналіз даних показав, що при обробці насіння перекисом водню і препаратом Азогран, відбувається збільшення по висоті всіх сортів ячменю у фазі виходу в трубку в порівнянні з варіантом, де рослини розвивалися з насіння, обробленого тільки перекисом водню. У всіх сортів ячменю у фазі цвітіння "воскова стиглість" зберігалися відмінності в висоті рослин ячменю при різних варіантах обробки посівного матеріалу. У даній роботі була встановлена також залежність інгібуючої впливу перекису водню на схожість насіння різних сортів ячменю від концентрації стрес-фактора. Також показано, що пост-обробка посівного матеріалу нанокomпозитний бактеріальним препаратом Азогран проявляла антиоксидантну дію на ріст рослин в різних фазах розвитку.

3.4. Технологія підготовки препарату Азогран при його застосуванні в агроєкосистем ячменю в умовах оксидативного стресу

У роботі показана ефективна протекторна роль нанокomпозитного комплексного бактеріального препарату Азогран в агроєкосистемі різних сортів ячменю. Це дозволило розробити технологічні схеми використання бактеріального препарату Азогран для його вираженої антиоксидантної дії на ріст ячменю в різних фазах розвитку.

Виходячи з отриманих нами результатів, ми вважаємо, що біотехнологія створення препаратів повинна враховувати як склад твердого носія, так і його концентрацію. Це дозволить запобігти негативному впливу дисперсності матеріалу на функціонування мікроорганізмів-компонентів препарату (рис. 3.23). Нами в роботі було показано, що запропонована технологічна схема підготовки і застосування нанокomпозитного комплексного бактеріального препарату Азогран з високими антиоксидантними властивостями в агроєкосистемі ячменю різних сортів Бурхант (Монголія), Віраж (Україна), Копленд (Канада) зумовлює ряд позитивних ефектів як на розвиток рослин, так і на урожайність злакової культури (рис. 3.24).

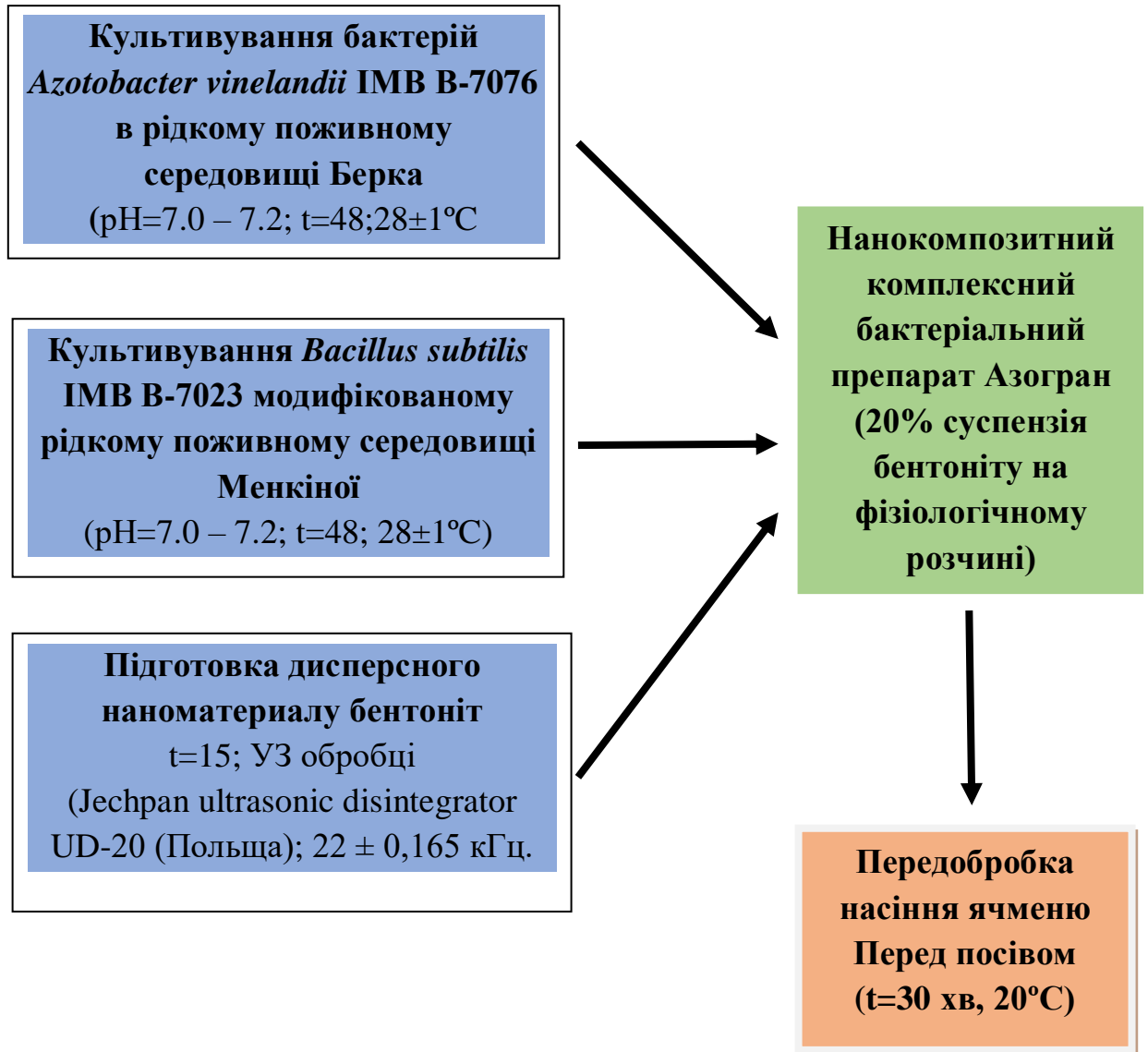


Рис. 3.23 – Схема підготовки комплексного бактеріального препарату Азогран для обробки насіння ячменю

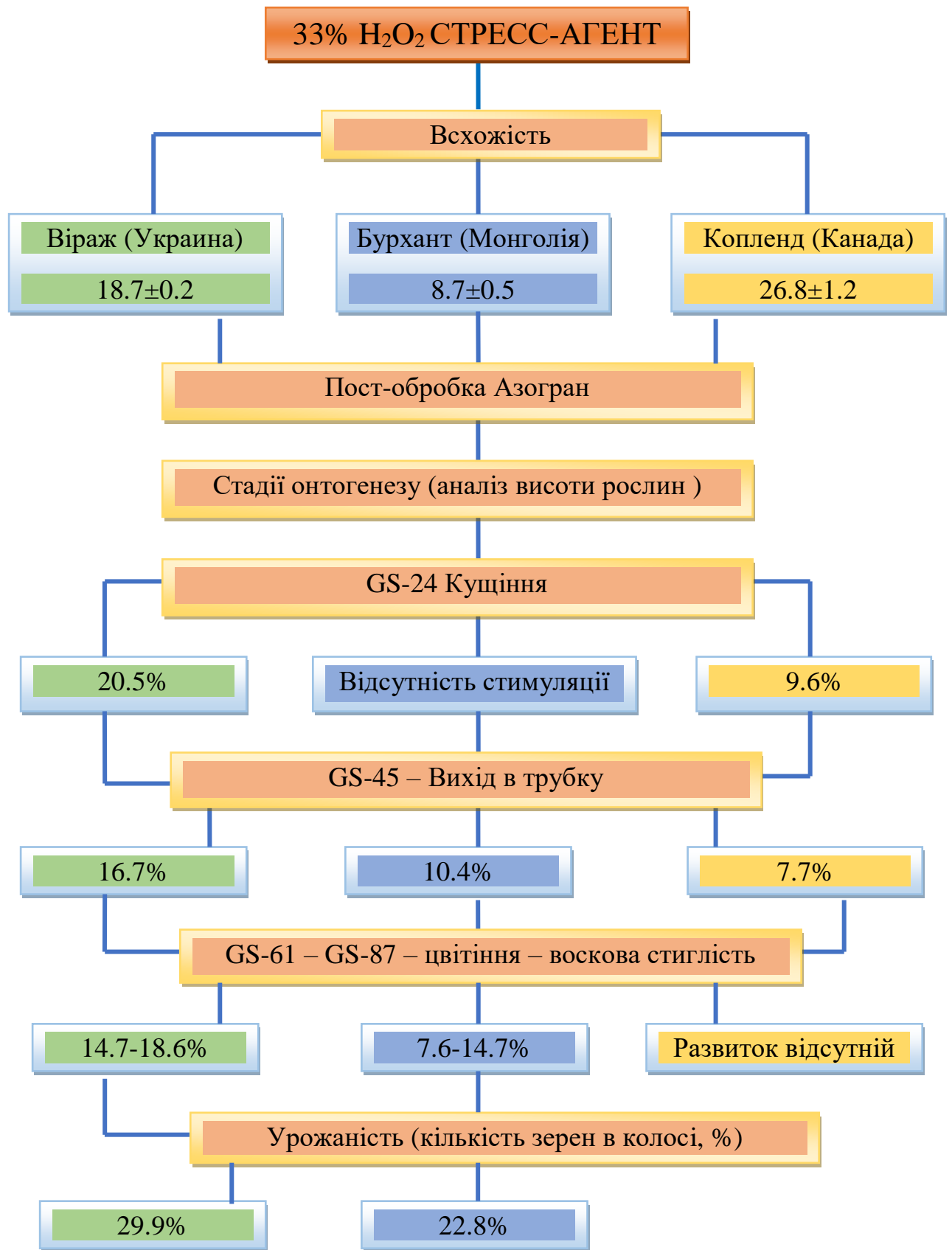
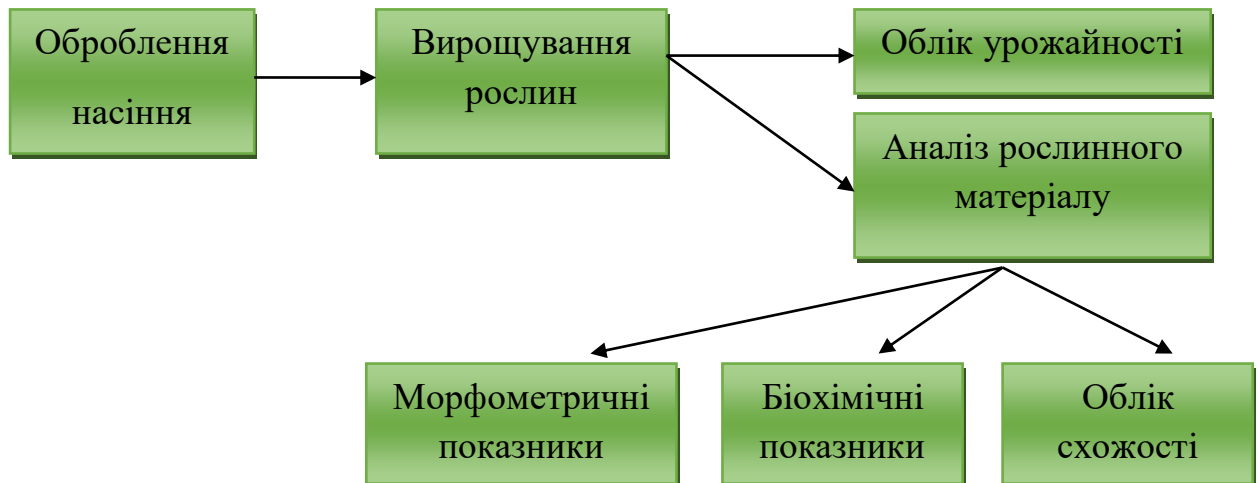


Рис. 3.24 – Ефективність впливу нанокompозитного комплексного бактеріального препарату Азогран на онтогенез стресованного насіння ячменю сортів Віраж, Бурхант, Копленд

Слід також враховувати, що використання особливостей технології застосування комплексного бактеріального препарату Азогран з необхідними антиоксидантними і протекторними властивостями для обробки насіння ячменя призводить до інших позитивних ефектів, як це було показано вище. Це дозволяє зробити розроблена схема технології досліджень впливу препарату Азогран на ріст ячменю і синтез фенольних сполук (рис. 3.25).



Дослід в теплиці

Пробопідготовка зразків для ВЕРХ-аналізу



Рис. 3.25 – Схема досліджень впливу Азогран на ріст ячменю і синтез фенольних сполук

РОЗДІЛ 4.

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження даної роботи багато в чому проводилось з метою визначення антиоксидантних і антирадикальних властивостей *Bacillus subtilis* IMB B-7023 і *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 – компонентів нанокomпозитного комплексного бактеріального препарату Азогран, і їх протекторної ролі в агроєкосистемі ячменю.

При цьому нами встановлено, що при культивуванні *B. subtilis* IMB B-7023 і *A. vinelandii* IMB B-7026 в поживних середовищах з низьким вмістом бентоніту (0,05 г/л) антиоксидантні і антирадикальні властивості метаболітних комплексів цих бактерій підвищувалися. Тоді як зі збільшенням концентрації глинистого мінералу до 0,1 – 0,5 г/л ряд показників антиоксидантного статусу метаболітних комплексів досліджуваних штамів знижувався. Зокрема, для метаболітного комплексу *A. vinelandii* IMB B-7026 АРА по відношенню до DPPH· знижувалася на 2,8 – 11,6%, а для метаболітного комплексу *B. subtilis* IMB B-7023 на 2,9 – 9,2% , в порівнянні з варіантом, де бактерії культивували з 0,05 г/л бентоніту. Також для бацил відзначено зниження АРА по відношенню до ·ОН на 6,2 – 11,0%, до ABTS^{·+} – на 4,0 – 11,8%, в порівнянні з отриманими показниками, коли *B. subtilis* IMB B-7023 вирощували з низьким вмістом наноструктурованого мінералу. Крім того, висока концентрації бентоніту інгібувала синтез сполук фенольної природи у *A. vinelandii* IMB B-7026 на 4,7 – 15,6 мкг/мл, а у *B. subtilis* IMB B-7023 – на 6,5 – 8,2 мкг/ мл.

Негативний ефект високого вмісту бентоніту в поживних середовищах досліджуваних штамів може бути пов'язаний зі збільшенням концентрації деяких іонів з прямим впливом на антиоксидантні властивості біооб'єктів. Згідно з дослідженнями Zhu з співавторами [334], при мінеральній стимуляції бактерії продукують метаболіти, які сприяють вивільненню основних катіонів з бентоніту. Зокрема, це Ca²⁺ [142]. Надлишок іонів Ca²⁺ в

цитозолі клітин може ініціювати посилення утворення АФК та навіть запустити процес апоптозу [165, 264, 276, 335]. А також може активізувати ензими, які беруть участь в окисленні фенольних сполук, що в результаті призводить до зниження концентрації цих важливих біологічно активних компонентів [270].

Однак нами встановлено і стимулюючу дію високого вмісту бентоніту на відновну здатність і метал-хелатуючу активність метаболітного комплексу *A. vinelandii* IMB B-7026. Так при внесенні в живильне середовище Ешбі 0,5 г/л даного мінералу ці показники підвищувалися на 37,1% і 35,1% відповідно до контролю. Можливо, це пов'язано з присутністю в хімічній структурі бентоніту іонів двох і трьохвалентного заліза [5]. Згідно даних літератури [99], серед різних видів роду *Azotobacter* бактерії *A. vinelandii* синтезують низькомолекулярні метаболіти – сидерофори, які представляють собою Fe-хелатуючі молекули. Вони блокують на початкових стадіях реакцію Фентона, яка ініціюється іонами заліза [137, 282].

Також було виявлено, що бентоніт значно впливав на кількісний склад фенолкарбонових кислот, синтезованих *B. subtilis* IMB B-7023. При культивуванні цього штаму з 0,05 г/л бентоніту концентрація галової кислоти в метанольному екстракті метаболітного комплексу бактерій збільшилася на 12,9%, транс-коричної кислоти на 54,4%, в порівнянні з контролем. У разі збільшення концентрації бентоніту до 0,5 г/л кількість галової кислоти збільшилася на 31,9%, 4-ГФОК – на 54,8%, а транс-коричної кислоти зменшилася на 35,1%. Вплив глинистого мінералу на синтез фенольних кислот бактеріями безпосередньо пов'язаний з його концентрацією в живильному середовищі і хімічною структурою досліджуваних бактеріальних метаболітів [163, 246].

Ефективність використання мікробних препаратів у агроєкосистемі рослин залежить від спектра біологічно активних речовин, що синтезуються мікроорганізмами-компонентами. Серед метаболітів бактерій важлива роль

належить антиоксидантам, які підвищують стрес-толерантність фітооб'єктів [325]. Однак механізми інактивації АФК цими сполуками не вивчені.

Нами встановлено, що 2,3-дигідро-3,5-дигідрокси-6-метил-4 (Н)-піран-4-ону – метаболіту *Bacillus subtilis* IMB B-7023 властиві антиоксидантні властивості, які розраховували за допомогою методу теорії функціональної щільності. Встановлено також, що в реакціях перехоплення та інактивації оксидантов задіяна тільки 5-ОН група.

Важливим показником при дослідженні антиоксидантного статусу біологічно активних сполук має антирадикальна активність по відношенню до DPPH· [280]. Відновлення цього стабільного вільного радикала в DPPH-H відбувається за механізмом НАТ, згідно якому відбувається донація атома водню від антиоксиданту до R·, і в результаті утворюється нейтральна молекула [122]. Важливим термодинамічним показником цього механізму є ентальпія гомолітичної дисоціації О-Н зв'язку (BDE). Механізм НАТ можливий тільки в тому випадку, коли BDE антиоксиданту нижче, ніж у деактивованої форми радикалу [130].

Згідно з результатами порівняльного аналізу BDE DDMP і DPPH-H нами встановлено, що ентальпія дисоціації 5-ОН досліджуваного метаболіту бацили становила 82,4 ккал/моль, а DPPH-H – 80 ккал/моль [218]. Оскільки різниця була не великою, це свідчило про низьку здатність DDMP інактивувати вільні радикали з допомогою механізму НАТ.

Ще одними важливими антиоксидантними механізмами, які характеризують здатність досліджуваного біоматеріалу або сполуки до перехоплення високо агресивного радикалу гідроксилу, являються SET і SET-PT. Основні термодинамічні показники цих механізмів – адіабатичний іонізаційний потенціал (AIP) і ентальпія дисоціації протона (PDE) [252].

Згідно проведеним квантово-хімічними розрахунками, AIP і PDE для DDMP становили відповідно 187,1 ккал/моль і 209,4 ккал/моль, що свідчило про ефективну інактивацію гідроксильного радикалу досліджуваним метаболітом *Bacillus subtilis* IMB B-7023. Це також підтверджувалося

показником енергії верхньої зайнятої молекулярної орбіталі, який корелював з АІР і був рівним – 6,390 еВ. Таким чином, 2,3-дигідро-3,5-дигідрокси-6-метил-4 (Н)-піран-4-ону в умовах його функціонування в ліпідно-пептидному середовищі мембран властиві тільки SET і SET-PT механізми. Відповідно, цю сполуку можна охарактеризувати як антиоксидант середньої сили.

Як нами було приведено в 1 розділі, пероксид водню відіграє подвійну роль в рослинах. При низьких концентраціях він, мабуть, діє як сигнальний месенджер, що запускає толерантність до різноманітних стресів навколишнього середовища [146, 190], тоді як при високих – ця молекула керує запрограмованою загибеллю клітин [147]. В літературі повідомляється, що екзогенне застосування H_2O_2 може поліпшити проростання насіння як в неактивному, так і в активному насінні [23].

Згідно з результатами проведених нами досліджень встановлено, що при дії 6% перекису водню на насіння всіх досліджуваних сортів ячменю їх всхожість збільшувалася. Відповідно, всхожість була вище, ніж у контрольному варіанті для ячменю сорту Віраж на 186,1%, Бурхант – на 22,5% і Копленд – на 31,4% [305].

Недавні дослідження показали, що такі оптимальні концентрації H_2O_2 важливі для нормального росту рослин, фотосинтетичних характеристик і антиоксидантної активності, а також для адаптації до різноманітних стресів навколишнього середовища [196].

В роботі [318] встановлено, що попередня обробка насіння кукурудзи з використанням H_2O_2 спочатку привела до підвищення концентрації цього стрес-агенту в посівному матеріалі, а потім до зниження через 8 годин. Це свідчить про активацію перехоплювачів H_2O_2 , які елімінують негативні ефекти даної АФК.

Barba-Espin G. з колегами показали, що обробка насіння гороху перекисом водню (H_2O_2) в низьких концентраціях збільшувала швидкість проростання і ріст проростків [106]. Згідно з результатами досліджень Хамеєд А. зі співавт. (2004), екзогенне застосування H_2O_2 в низьких дозах

сприяє розвитку більш сильної кореневої системи у пшениці [171]. Іншими авторами відзначено позитивну дію низьких концентрацій пероксиду водню на онтогенез чорнобривців і солодкої картоплі [151]. Існує багато повідомлень про те, що стимулювання проростання насіння обробкою перекисом водню може бути результатом окислення інгібіторів проростання, присутніх в оболонці насіння і / або в перикарпії [136, 154, 178, 198, 245].

Дисбаланс в сторону підвищення концентраційного рівня H_2O_2 характеризує цю АФК як ініціатора перекисного окислення ліпідів і джерела утворення більш небезпечного для живих клітин гідроксильного радикалу (ОН) [112]. В результаті відбувається лізис мембран, який може бути фактором аномального онтогенезу рослин [127].

Відповідно до проведених досліджень, дія 20% і 33% H_2O_2 мала негативний ефект на схожість посівного матеріалу досліджуваної злакової культури. Зокрема, при обробці насіння ячменю сорту Віраж 20% H_2O_2 цей показник знизився на 14,3%, сорту Бурхант – на 19,5% і сорту Копленд – на 2,4%, відносно контролю. Обробка посівного матеріалу експериментальних сортів ячменю 33% H_2O_2 ще більш інтенсивно інгібувала їх схожість. Відповідно, досліджуваний показник для насіння ячменю сорту Віраж знизився на 31,7%; сорту Бурхант – на 66,9% і сорту Копланд – на 41,2%, в порівнянні з контрольним варіантом [58, 305].

Нами показано, що виходу насіння з стресу може супроводжувати їх пост-обробка нанокомпозитним комплексним бактеріальним препаратом Азогран. Основними його складовими є високоефективні штами *A. vinelandii* IMB B-7076 і *B. subtilis* IMB B-7023. Отримані дані узгоджуються з результатами роботи [81], де відновленню стресованого насіння пшениці супроводжувала його обробка *Bacillus polymyxa* і *Azotobacter chroococcum*. Антиоксидантна відповідь цих та інших бактерій, що використовуються в агробіотехнології, може істотно відрізнятись [34, 81].

Встановлено, що обробка Азограном краще впливала на розвиток насіння та рослин сорту Віраж. Відповідно на стадії воскової стиглості (фаза

тверда стиглість – GS 87) висота рослин цього сорту при обробці біопрепаратом була вище на 5,26%, а сорту Бурхант – на 4,29%, ніж в контролі. Тоді як при пост-обробці Азограном стресованих насіння двох сортів цей показник підвищувався на 18,56% для сорту Віраж і на 14,72% для сорту Бурхант, в порівнянні з дією на посівний матеріал тільки стрес-агенту [58, 72, 305, 306].

Ячмінь сорту Копленд розвивався в тепличних умовах до стадії виходу в трубку (фаза набухання оболонки прапорцевого листка – GS 45). Однак дія нанокмпозитного комплексного бактеріального препарату мала ефект. Висота його рослин при обробці насіння тільки Азограном підвищувалася на 3,14%, в порівнянні з контрольним варіантом. Тоді як пост-обробка цим біопрепаратом стресованих насіння супроводжувала підвищення досліджуваного морфометрического показника на 7,71%, в порівнянні з варіантом, де рослини розвивалися з посівного матеріалу, обробленого стрес-агентом.

Отримані дані підтверджують теорію, згідно з якою, вплив бактерій-компонентів біопрепаратів залежить від видових і сортових характеристик рослин і штамів мікроорганізмів [168].

Багато досліджень продемонструвало, що взаємодії між рослинами і бактеріями відбуваються через симбіотичні, ендofітні або асоціативні процеси з різним ступенем близькості з країнами і навколишнім ґрунтом [266]. Згідно з результатами роботи [75], обробка рослин пшениці *Bacillus subtilis* 26Д підвищувала їх стресостійкість до хлоридного засолення і дефіциту вологи. Інокуляція стресованих рослин рису штамом *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN 13 активізувала накопичення осмолітів для підтримки гомеостазу і ряду біохімічних процесів [238]. Ряд представників ризосферної мікрофлори *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* та ін. здатні знижувати токсичний вплив іонів важких металів на біохімічні процеси в рослинах [176]. Обробка коренів томатів *A. chroococcum* 76А сприяла зростанню рослин, стресостійкості і

ефективності засвоєння поживних речовин при помірному та сильному засоленості. Використання цього штаму бактерій може бути ідеальним рішенням для зниження негативного впливу факторів навколишнього середовища на врожайність цінних агрокультур [312].

Активна участь стмуючих ріст рослин ризобактерій (PGPR) (представники родів *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* та ін.) в захисті рослин від різних стресових факторів відіграє важливу роль в поліпшенні їх росту, розвитку і збільшенні урожайності [96, 113, 121, 205, 257].

Нами встановлено, що обробка Азограном як нестресованого, так і стресованого насіння ячменю сортів Віраж і Бурхант супроводжувала збільшення кількості зерен в колосі. Раніше було показано, що *A. vinelandii* IMB B-7076 і *B. subtilis* IMB B-7023 – компоненти цього препарату виявляють антиоксидантну дію на насіння жита і пшениці, стимулюють формування їх проростків, а також підвищують продуктивність як злакових, так і інших культур на 14–37% [55, 56, 182, 207].

Andhare A. зі співавторами встановили, що бактеризація насіння нуту трьома ізолятів *A. vinelandii* супроводжувала підвищення схожості і швидкості проростання насіння, індексу сили проростання, висоти рослин, а також кількості гілок на них [92]. В роботі [139] вивчено *in vitro* взаємодія штамів *A. vinelandii* SRIA3 і *Serendipita indica* і виявлено їх кумулятивний вплив на ріст рису. Послідовна інокуляція мікроорганізмами продемонструвала приріст біомаси коріння і вмісту хлорофілу в порівнянні з неінокульованими і моноінокульованими рослинами.

Бактерії *B. subtilis* також ефективно впливають на онтогенез і врожайність різних видів рослин. Ряд авторів показали, що при обробці насіння вики, бобів, чорного вівса *Bacillus* sp. значно збільшувалися довжина, маса, зростання їх пагонів і коренів [177]. Колонізація коренів томатів *B. subtilis* PTS-394 стимулювала ріст рослин і подавляла фітопатогени [258].

Результати Murugesan Ch і др. показали, що штам *B. subtilis* CBR05 збільшує продуктивність томатів за рахунок підвищення їх антиоксидантної активності і рівня каротиноїдів (β -каротину і лікопіну) в плодах [126].

З результатів, отриманих в цьому дослідженні, можна зробити висновок, що інгібуючий вплив перекису водню на проростання насіння і розвиток рослин різних сортів ячменю зростає зі збільшенням концентрації цього стресового агента. Подальша обробка наноккомпозитним комплексним бактеріальним препаратом Азогран стресованого насіння досліджуваної злакової культури стимулювала зростання рослин на різних етапах їх розвитку і сприяла утворенню більшої кількості зерен в колосі. Це вказує на здатність бактерій-компонентів наноккомпозитного комплексного бактеріального препарату Азогран підвищувати стійкість рослин ячменю до пероксидного стресу.

Механізм формування стрес-толерантності рослин за допомогою біопрепаратів тісно пов'язаний з метаболітами бактерій, що входять до їх складу. Ряд цих сполук розглядаються як тригери, що запускають каскад властивих рослинам біосинтетичних процесів, що підвищують опірність до шкідливої дії оксидантів [311, 325]. Одним з таких процесів може бути активація продукування в організмі фітооб'єктів різноманітності фенольних сполук з підвищеним рівнем їх вмісту.

Нами встановлені суттєві відмінності в якісному і кількісному складі фенольних сполук в рослинах різних сортів ячменю, насіння яких піддавали різним варіантам обробки. Відповідно, якісний склад фенолкарбонових кислот у вільній фракції метанольних екстрактів рослин різних сортів ячменю, насіння яких обробляли або стерильною дистильованою водою, або Азограном, не відрізнявся. Тоді як кількісний склад по кожній з ідентифікованих фенолкарбонових кислот різко підвищувався в рослинах ячменю сорту Віраж при інокуляції його насіння наноккомпозитним комплексним бактеріальним препаратом. Відповідно, 4-ГФОК – на 126,0%, хлорогенова – на 158,8%, каваова – на 117,9%, сірінгова – на 116,4%, бензойна

– на 123,9%, п-кумарова – на 230, 2%, сінапова – на 97,9% і транс-корична кислот – на 106,9%.

Дія агресивного стрес-агента H_2O_2 на насіння різних сортів ячменю була найбільш негативною на кількісний склад вільних фенольних сполук в рослинах сорту Бурхант і Копленд. В результаті для ячменю сорту Бурхант найбільш сильно знижувалася кількість кавової – на 72,1%, бензойної – на 89,1% і сінапової кислот – на 83,8%, в порівнянні з контрольним варіантом. А для сорту Копленд кількість сірінгової, бензойної, п-кумарової і сінапової кислот була нижче, ніж в контролі, на 16,7%, 44,7%, 25,85% і 20,3% відповідно. Більш того, в рослинах ячменю сортів Бурхант і Віраж не ідентифікувалась сірінгова кислота. Вищевказані фенольні кислоти дуже важливі, тому що беруть участь у формуванні резистентних реакцій різних злакових [286].

Пост-обробка стресованого посівного матеріалу різних сортів ячменю бактеріальним препаратом Азогран найбільш виражено впливала на збільшення кількості вільних фенольних кислот в рослинах сорту Бурхант. Відповідно, вміст хлорогенової підвищувався на 33,1%, бензойної – на 24,3%, сінапової – на 34,1% і транс-коричної кислот – на 58,5%.

В зв'язаній фракції фенолкарбонових кислот, отриманої з рослин ячменю різних сортів, були виявлені також істотні відмінності, пов'язані з обробкою насіння. Пероксид водню негативно впливав на синтез досліджуваних фенольних сполук у всіх сортах. Тоді як пост-обробка наноккомпозитним комплексним бактеріальним препаратом Азогран викликала істотне збільшення кількості транс-ферулової кислоти в рослинах сорту Віраж – на 33,6% і хлорогенової кислоти в рослинах сорту Бурхант – на 32,6%. Механізм антиоксидантної дії ферулової кислоти є складним, в основному заснований на інгібуванні утворення активних форм кисню (АФК) або азоту, а також на нейтралізації вільних радикалів. Крім того, ця кислота відповідає за хелатування протонуваних іонів металів, таких як Cu (II) або Fe (II) [233]. Феруловая кислота не тільки переводить вільні радикали в нейтральні

молекули, але і пригнічує ензими, які каталізують генерацію вільних радикалів [119, 223].

Крім фенолкарбонових кислот в рослинах різних сортів ячменю, насіння яких піддавали різним варіантам обробки, досліджували вміст фракцій вільних і зв'язаних флавоноїдів. При цьому виявлено суттєві відмінності.

Обробка посівного матеріалу Азограном сприяла збільшенню кількості вільних флавоноїдів в рослинах сортів Бурхант і Віраж на 41,8% і 37,8%, в порівнянні з контрольним варіантом. У той же час, в рослинах ячменю сорту Бурхант, які розвивалися з стресованого насіння, синтез досліджуваних речовин або знижувався, або повністю блокувався. Відповідно з 4-х ідентифікованих флавоноїдів виявлявся тільки кверцетин-3- β -глюкозид. Це може бути пов'язано з окисленням пероксидом водню ряду флавоноїдів [111]. Пост-обробка Азограном найбільш ефективно впливала на флавоноїдний комплекс рослин сорту Бурхант. При цьому поновлювалася ідентифікація рутину. Рутин, як відомо, сприятливо впливає на здоров'я людини, наприклад, має протизапальну, антиканцерогенну, серцево-судинну дію, знижує артеріальний тиск, концентрацію цукру в крові і підвищує антиоксидантну активність [100].

Вміст флавоноїдів в зв'язаній фракції був набагато вище, ніж в вільній. Згідно з отриманими результатами, нанокмпозитний комплексний бактеріальний препарат Азогран найбільш ефективно впливав як на якісний, так і на кількісний склад фенольних сполук в рослинах ячменю сортів Бурхант і Віраж. Також сприяв стабілізації цих сполук в стресованих рослинах всіх сортів ячменю.

ВИСНОВКИ

1. У роботі визначено, що технологія пост-обробки насіння ячменю комплексним біопрепаратом Азогран, з використання антиоксидантного потенціалу його бактерій-компонентів, сприяє збільшенню урожайності і поліпшенню розвитку сортів Віраж, Бурхант і Копленд з різних кліматичних зон.
2. Встановлено, що підвищена ефективність антиоксидантних та антирадикальних властивостей метаболітних комплексів *Azotobacter vinelandii* і *Bacillus subtilis* визначається концентрацією бентоніту (0.05–0.1 г/л) в живильному середовищі, при яких антиоксидантний потенціал метаболітних комплексів збільшувався до максимального значення ефективності.
3. Отримані значення термодинамічних показників механізмів інактивації агресивних стрес-агентів для 2,3-дигідрокси-6-метил-(4Н)-піран-4-ону (DDMP) – метаболіту *Bacillus subtilis*, дозволили встановити, що DDMP має властивості групи антиоксидантів середньої сили.
4. Показано, що обробка біопрепаратом Азогран насіння ячменю після впливу стрес-агенту сприяла збільшенню висоти рослин у фазі виходу в трубку, відповідно, для сорту Віраж – на 16,7%, для сорту Бурхант – на 10,4%, а для сорту Копленд – на 7,7%, в порівнянні з з ростом рослин, які розвивались із насіння обробленого 33% розчином H_2O_2 . Число зерен в колосі зростало: Віраж – на 30%, Бурхант – на 23%.

5. Виявлено, що пост-обробка нанокompозитним комплексним бактеріальним препаратом Азогран насіння різних сортів ячменю суттєво впливала на збільшення і поліпшення якісного і кількісного складу фенолкарбонових кислот і флавоноїдів, яким притаманний широкий спектр біологічно важливих властивостей.
6. Розроблена і запропонована біотехнологічна схема використання нанокompозитного комплексного бактеріального препарату Азогран для збільшення прибавок до урожайності і стресостійкості різних сортів ячменю з різних кліматичних зон.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] Абизгильдина Р. Р. Индукция защитной системы пшеницы и картофеля эндوفитными бактериями *Bacillus subtilis* 26Д. Диссертация. 2012
- [2] Артамонова М. Н. Ризосферные бактерий *Bacillus subtilis* и их ростстимулирующее влияние на *Cucurbita Pepo L.* Диссертация. 2017
- [3] Арькова Ж. А, Крюков А. А. Селекция и генетика ячменя: курс лекций. Мичуринск-наукоград РФ, 2008; с. 22
- [4] Белявская Л. А. Актинобактерии рода *Streptomyces* и их метаболиты в биорегуляции растений: Автореф. дис. 2018; с. 48
- [5] Боева Н. М, Наседкин В. В. Сравнительная характеристика двух генетических типов месторождений бентонитового сырья. Изв. вузов. Геология и разведка. 2009; 6:27-31
- [6] Боронин А. М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие прирост и развитие растений. Соросовский образовательный журнал. 1998; 10:25-31
- [7] Булдаков С. А, Плеханова Л. П. Применение биологического препарата экстразола эффективно на семенном картофеле. Сельскохозяйственные науки. 2020; 4(94):40-45
- [8] Ванюшин Б. Ф. Апоптоз у растений. Успехи биологической химии. 2001; 41: 3-38
- [9] ГКЗ. Методические рекомендации по применению Классификации запасов месторождений и прогнозных ресурсов твердых полезных ископаемых. Глинистые породы. 2007
- [10] Гордиенко А. С, Антонюк Т. С, Курдиш И. К. Влияние глинистых минералов на адгезию бактерий-компонентов гранулированных препаратов для растениеводства. Микробиологи и Биотехнология. 2009; 1:64-69
- [11] Дмитрієв О. П, Кравчук Ж. М. Активні форми кисню та імунітет рослин. Цитологія і Генетика. 2005; 39(4):64-75

- [12] Добровольская Т. Г, Скворцова И. Н, Лысак Л. В. Методы выделения и идентификации почвенных бактерий. Изд-во МГУ. 1989; с. 71
- [13] Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. Агропромиздат, 1985; с. 351
- [14] ДСТУ 4138-2002. Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості. Чинний від 2004-01-01. К: Держспоживстандарт Україна. 2003; с. 173
- [15] Дьяков Ю. Т, Озерецковская О. Л, Джавахия В. Г, Багирова С. Ф. Общая и молекулярная фитопатология. Общество фитопатологов. 2001. с. 302.
- [16] Завалин А. А. Биопрепараты, удобрения и урожай. ВНИИА. 2005; с.302
- [17] Завалин А. А. Применение биопрепаратов при возделывании полевых культур. НТП: земледелие и растениеводство. 2011; 8:9-11
- [18] Злотников А. К, Злотников К. М. Применение биопрепарата для повышения устойчивости растений к засухе и другим стрессорам. Агро XXI. 2007; 10(12):37-38
- [19] Казаков А. С, Гайдаш М. В. Система антиоксидантной защиты растений в условиях водного стресса. Известия вузов. СевероКавказский регион. Естественные науки. Приложение. 2005; 5:62–68
- [20] Кирпичников Н. А, Волков А. А. Влияние биопрепаратов на урожайность и качество ячменя и клевера в зависимости от применения фосфорных и известковых удобрений. НТП: земледелие и растениеводство. 2011; 8:15-18
- [21] Козлов А. В, Куликова А. Х, Уромова И. П. Продукты выщелачивания в бактериальной системе «Порода-культура» при биохимической деградации силикатными бактериями диатомита, цеолита и бентонита. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2017; 19(2):281-288
- [22] Копылов Е. П. Грунтовые грибы как биотический фактор влияния на растения. Сельскохозяйственная микробиология. 2012; 15(16):7-28

- [23] Корзинников Ю. С. Экологически безопасные средства защиты растений. Вестник РАСХН. 1997; 2:44–47
- [24] Котляров В. В, Донченко Д. Ю, Котляров Д. В, Сединина Н. В. Средство для микробиологической защиты растений и способ микробиологической защиты растений с использованием этого средства. 2013; RU2539025C1
- [25] Коць С. Я, Волкогон М. В, Грищук О. О. Способность штаммов и Тn5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum* к синтезу ИУК и АБК in vitro. Физиология и биохимия культурных растений. 2010; 42(6):491-496
- [26] Кудоярова Г. Р, Курдиш И. К, Мелентьев А. И. Образование фитогормонов почвенными и ризосферными бактериями как фактор стимуляции роста растений. Известия уфимского научного центра РАН. 2011; 3(4):5-16
- [27] Курдиш И. К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства: Наука и Практика. 2001; с. 141
- [28] Курдиш І. К. Влияние біогенних та абіогенних факторів на ефективність інтродукції мікроорганізмів у агроєкосистеми. Мікробіологія і Біотехнологія. 2009; 1:22-38
- [29] Курдиш И. К. Інтродукція мікроорганізмів у агроєкосистем. Наукова думка. 2010; с. 255
- [30] Курдиш И. К. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми материалами и наноматериалами как основа новых биотехнологий. Микробиологи. 2018; 80(3):15-28
- [31] Лакин Г. Ф. Биометрия. Высшая школа. 1990; с. 352
- [32] Луцзяк В. І. Редокс-сенсори мікроорганізмів. Укр. Біохим. 2008; 80(4):25–34
- [33] Ляхович В. В, Вавилин В. А, Зенков Н. К, Меньщикова Е. Б. Активная защита при окислительном стрессе. Антиоксидант-респонсивный элемент. Биохимия. 2006; 71(9):1183–1197

- [34] Манжелесова Н. Е, Манжелесова Л. А. Влияние фенольных соединений штамма бактерий рода *Bacillus* (биопрепарат «Миколин») на болезнеустойчивость ячменя. Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы докладов VIII Международного симпозиума. М: ИФР РАН; РУДН. 2012; с. 384
- [35] Маслак Д. В, Феклистова И. Н, Гринева И. А, Скакун Т. Л, Садовская Л. Е, Максимова Н. П. Активность целлюлолитического комплекса индуцированных мутантов *B. subtilis*. Микробиология. 2015; 10(1):82-89
- [36] Менкина Р. А. Бактерии, минерализующие органические соединения фосфора. Микробиология. 1950; 19(4):308–315
- [37] Мерлич А. Г, Лиманская Н. В, Жунько И. Д, Бабенко Д. А. Влияние *Lactobacillus plantarum* и *Bacillus atrophaeus* на прорастание семян и рост проростков пшеницы. Микробиология и биотехнология. 2017; 1:36-47
- [38] Миркин Б. М, Усманов И. Ю, Наумова Л. Г. Типы стратегий растений: место в системах видовых классификаций и тенденции развития. Журн. общей биол. 1999; LX:581–595
- [39] Мошинец О. В, Косаковская И. В. Экология фитосферы: растительно-микробные взаимоотношения. Структурно-функциональная характеристика ризо, эндо и филосферы. Биология. 2010; 2:19-35
- [40] Надкерничний А. В. Азотфиксирующие микробно-растительные симбиоз. Сельскохозяйственная микробиология. 2005. 1(2):105-127
- [41] Новикова И. И. Биологические средства защиты растений технологии их подготовки и применения. Пб.: ВИЗР. 2005; с. 303-330
- [42] Озерецковская О. Л, Васюкова Н. И. При использовании элиситоров для защиты сельскохозяйственных растений необходима осторожность. Прикл. биохимия и микробиология. 2002; 38:322-325
- [43] Пат. №54923 А. Штам бактерий *Bacillus subtilis* для одержання бактеріального добрива для рослинництва. Україна. 2003; № 3

- [44] Пат. №72856. Штам бактерій *Azotobacter vinelandii* для одержання бактеріального добрива для рослинництва. Україна. 2006; №8
- [45] Петров В. Б, Чеботарь В. К. Микробиологические препараты – базовый элемент современных интенсивных агротехнологий растениеводства. НТП: Земледелие и Растениеводство. 2011; 8:11-15
- [46] Пронина Н. Б. Экологические стрессы (причины, классификация, тестирование, физиолого-биохимические механизмы). Изд-во Мос. сельхоз. Акад, 2000; с. 310
- [47] Ретьман С, Ткаленко Г, Михайленко С. Биологические препараты против болезней зерновых колосовых культур. Предложение. Современные агротехнологии по применению биопрепаратов и регуляторов роста. 2015; с. 18-20
- [48] Розметов К. С. Эффективность предпосевной обработки семян хлопчатника в условиях луговых почв. Молодой ученый. 2011; 1(24):302-304
- [49] Рой А. А, Никоненко В. У, Гвоздяк П. И. Влияние способа дезинтеграции клеток *Bacillus subtilis* 21/3 на ферментативную активность бесклеточных экстрактов. Микробиологический журнал. 1982; 44(1):15–17
- [50] Рой А. А, Рева О. Н, Курдиш И. К, Смирнов В. В. Биологические свойства фосфатмобилизирующего штамма *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023. Прикл. Биохимия и Микробиология. 2004; 40(5):551–557
- [51] Рой А. А, Пасичник Л. А, Церковняк Л. С. Влияние бактерий рода *Bacillus* на возбудителя бактериального рака томатов. Мікробіол. журн. 2012; 74(5):74–80
- [52] Романенко Н. Д, Заец В. Г, Козырева Н. И, Попов И. О, Таболин С. Б. Биологические средства защиты растений в борьбе с фитопаразитическими нематодами, другими патогенами и перспективы их использования в XXI веке. Вестник РУДН. Серия: Агрономия и животноводство. 2008; 2:39-51

- [53] Рубенчик Л. И. Азотобактер и его применение в сельском хозяйстве. Изд. АН УССР, Киев, 1960; с. 328
- [54] Сидакова М. С. Влияние минеральных удобрений и биопрепаратов на урожайность зерна ячменя. Кабардино-Балкарский ЦНТИ, инф. листок № 33001-05 Нальчик. 2005
- [55] Скороход І. О, Церковняк Л. С, Курдиш І. К. Антиоксидантна дія *Bacillus subtilis* і *Azotobacter vinelandii* на насіння злакових культур. Мікробіол. 2011; 73(1):44–50
- [56] Скороход И.А. Антирадикальная активность 4-гидроксифенилуксусной кислоты – компонента культуральной среды *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023. Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: Все российской конференции молодых ученых. 2012; 6:90
- [57] Скороход И. А. Антиоксидантные свойства *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 компонента комплексного бактериального препарата Азогран. Диссертации. 2016
- [58] Скороход И. А, Улзийжаргал Е, Курдиш И. К, Горго Ю. П. Влияние нанокompозитного биопрепарата Азогран на семена ячменя, подвергнутые оксидативному стрессу. Scientific Light. 2020; 36:10-14
- [59] Снытко В. А, Собисевич А. В, Шёнфельдер Т. Вторичное засоление почв как эколого-географическая проблема. Эколого-географические проблемы регионов России. Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Самара, 2017. с. 225-228
- [60] Старцева А. А, Фадькин Г. Н. Влияние микробиологических препаратов на формирование урожая ярового ячменя. Международный технико-экономический журнал. 2014; 5:81-87
- [61] Сытников Д. М. Биотехнология микроорганизмов азотфиксаторов и перспективы применения препаратов на их основе. Biotechnologia Acta. 2012; 5(4):34-45

- [62] Терентьев А. Н. Bentonит и возможное его применение в медицине. 1994; с. 274
- [63] Титова Е. М, Внукова М. А. Влияние биопрепаратов на продуктивность ячменя. Вестник Орел ГАУ. 2012; 4:58-60
- [64] Тихонович И. А, Кожемяков А. П, Чеботарь В. К. Биопрепараты в сельском хозяйстве: Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве. Россельхозакадемия. 2005; с.154
- [65] Ткачев В. И, Гуляев Б. И. Реакция растений разных сортов озимой пшеницы на кратковременную почвенную засуху. Физиология и биохимия культ. Растений. 2010; 42(6):522–529
- [66] Токмакова Л. Н. Разработка приемов и создания микробиологических препаратов для улучшения фосфатного питания и повышения продуктивности сахарной свеклы. автореф. дис. 1997. 20 с.
- [67] Третьяков Н. Н. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений. Колос. 2005; с. 640
- [68] Турусов В. И, Сауткина М. Ю, Чевердин А. Ю, Чевердин Ю. И. Влияние биопрепаратов ассоциативных diaзотрофов на урожайность зерновых культур в условиях юго-востока Центрального Черноземья. Достижения науки и техники АПК 30. 2016; 30(5):38-42
- [69] Тютерев С. Л. Научные основы индуцирования болезнеустойчивости растений. С-Пб.: ООО «Инновационный центр защиты растений» ВИЗР, 2002; с. 328
- [70] Улзийжаргал Ерденецогт, Кравець А. П, Горго Ю. П. Экологические методы снижения зараженности зерна пшеницы. XIII междунар. Конференция по прикладной биофизике, бионике и биокibernетици. 2018; с. 23
- [71] Улзийжаргал Ерденецогт, Горго Ю. П. Особенности работы иммунной системы лекарственных растений. XIII междунар. Конференция по прикладной биофизике, бионике и биокibernетици. 2018; с. 24

- [72] Улзийжаргал Ерденецогт, Скороход И. О, Курдиш И. К, Горго Ю. П. Антиоксидантное действие биопрепарата Азогран на семена ячменя. Материалы XIV Всеукраинская НПК «Биотехнология XXI века» посвящена 135-летию со дня рождения А.В. Палладина. 2020; с.87
- [73] Фатина П. Н. Применение микробиологических препаратов в сельском хозяйстве. Вестник астраханского государственного технического университета. 2007; 4(39):133-136
- [74] Фридович И. Свободные радикалы в биологии. Мир. 1979; 1:272-308
- [75] Хайруллин Р. М, Недорезков В. Д, Мубинов И. Г, Захарова Р. Ш. Повышение устойчивости пшеницы к абиотическим стрессам эндофитным штаммом *Bacillus subtilis*. Вестн. Оренбургского гос. 2007; 2:129–134
- [76] Цавкелова Е. А, Климова С. Ю, Чердынцева Т. А, Нетрусов А. И. Микроорганизмы - продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор). Прикладная биохимия и микробиология. 2006; 42(2):133-143
- [77] Царенко И. Ю, Рой А. А, Курдиш И. К. Оптимизация питательной среды для культивирования *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023. Микробиологи. 2011; 73(2):13-19
- [78] Церковняк Л. С, Курдиш И. К. Фосфатмолитизирующие бактерии *Bacillus subtilis* – продуценти соединений фенольной природі. Прикладная биохимия и микробиология. 2009; 45(3):311–317
- [79] Чеботарева В. В, Бега З. Т, Курдиш И. К. Физиолого-биохимическая активность бактерий при прорастании семян огурцов и влияние инфузорий *Colpoda steinii* на этот процесс. Микробиол. 2015; 2:15-21
- [80] Шакирова Ф. М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. УФА: Гилем, 2001; с. 160
- [81] Шишкова Т. К, Руденская Ю. А, Лихолат Т. В, Мосолов В. В. Восстановление жизнеспособности семян пшеницы, подвергнутого

- стрессовому воздействию под влиянием ризосферных микроорганизмов. Докл. РАН. 1997; 356(2):286–296
- [82] Abhinandan K, Skori L, Stanic M, Hickerson N, Jamshed M, Samuel M. A. Abiotic stress signaling in wheat—an inclusive overview of hormonal interactions during abiotic stress responses in wheat. *Frontiers in Plant Science*. 2018; 9(734):1-25
- [83] Adesemoye A. O, Obini M, Ugoji E. O. Comparison of plant growth promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008; 39:423–426
- [84] Adnan K, Ehsan Sh, Dema A, Thomas H, Yahya E, Seyed A. T, Peter N. Morphological and molecular characterization of sweet, grain and forage sorghum (*Sorghum bicolor* L.) genotypes grown under temperate climatic conditions. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. 2020; 154(1):49-58
- [85] Adrian C. N, Andrew J. F, Timothy S. G, Philip L. B, Luke R, Cesar R, Joanne R, Brian J. S, Stuart S, William T. B, Robbie W, Philip J. W, Ian J. B. Barley: a resilient crop? Strengths and weaknesses in the context of food security. *Food Sec*. 2011; 3:141–178
- [86] Agostini S, Chiavacci E, Matteucci M, Torelli M, Pitto L, Lionetti V. Barley beta-glucan promotes Mn SOD expression and enhances angiogenesis under oxidative microenvironment. *Cell Mol. Med*. 2015; 19:227-38
- [87] Agriculture and Horticulture Development Board (AHDB). Barley growth guide. 2018; p.1-40
- [88] Ahmad M, Pataczek L, Hilger T. H, et al. Perspectives of microbial inoculation for sustainable development and environmental management. *Front Microbiol*. 2018; 9(2992):1-26
- [89] Alessandra F, Luca S. Abiotic stress effects on performance of horticultural crops. *Horticulturae*. 2019; 5(67):1-4
- [90] Ali S, Liu Y, Ishaq M, et al. Climate change and its impact on the yield of major Food Crops: Evidence from Pakistan. *Foods*. 2017; 6(39):1-19

- [91] Alori E. T, Glick B. R, Babalola O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front Microbiol.* 2017;8(971):1-8
- [92] Andhare A. A, Poudel A. S, Deshmukh A. J, Dargad J. S. Isolation of *Azotobacter* and study of its effect as a liquid formulation on seed germination and growth parameters of green gram (*Vigna radiata L*). *The Pharma Innovation Journal.* 2019; 8(4):336-341
- [93] Anton O, Alla Roy, Iryna Skorochoch, Ivan Kurdish. Influence of physical and chemical factors on the accumulation of phenolic compounds nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076. *Acta Velit.* 2016; 2(1):49-55
- [94] Antoun H, Kloepper J. W. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Encyclopedia of Genetics.* 2001; p. 1477-1480
- [95] Apostolova P, Yordanova R, Popova L. Response of antioxidative defense system to low temperature stress in two wheat cultivars. *Gen. Appl. Plant Physiol.* 2008; 34(3-4):281–294
- [96] Asghar H. N, Zahir Z. A, Arshad M, Khaliq A. Relationship between in vitro production of auxins by *Rhizobacteria* and their growth-promoting activities in Brassica Junceal. *Biol. Fertil. Soils.* 2002; 35(23):1–237
- [97] Atanasov A. G, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig E. M, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv.* 2015; 33(8):1582-1614
- [98] Ati F, Chergui A, Aboul-Enein H. Y, Maouche B. Antioxidant activity of some khelin derivatives: a density functional theory study. *Egyptian Pharmaceutical Journal.* 2018; 17:212–217
- [99] Baars O, Zhang X, Morel F. M, Seyedsayamdost M. R. The Siderophore Metabolome of *Azotobacter vinelandii*. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 82:27–39

- [100] Bai C. Z, Feng M. L, Hao X. L, Zhong Q. M, Tong L. G, et al. Rutin, quercetin, and free amino acid analysis in buckwheat (*Fagopyrum*) seeds from different locations. *Genet. Mol. Res.* 2015; 14:19040-19048
- [101] Baik B. K, Ullrich S. E. Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *J Cereal Sci.* 2008; 48:233-42
- [102] Baillo E. H, Kimotho R. N, Zhang Z, Xu P. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. *Genes* 2019; 10(771):1-23
- [103] Bais H. P, Weir T. L, Perry L. G, Gilroy S, Vivanco J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology.* 2006; 57:233-266
- [104] Bakker P. A.H.M, Pieterse C.M.J, Van Loon L. C. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology.* 2007; 97:239-243
- [105] Ban J. O, Hwang I. G, Kim T. M, Hwang B. Y, Lee U. S, Jeong H. S, Yoon Y. W, Kim D. J, Hong J. T. Anti-proliferate and pro-apoptotic effects of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranone through inactivation of NF- κ B in human colon cancer cells. *Arch Pharm Res.* 2007; 30:1455-1463
- [106] Barba-Espin G, Hernandez J. A, Diaz-Vivancos P. Role of H₂O₂ in pea seed germination. *Plant Signal Behav.* 2012; 7(2):193-195
- [107] Bardgett R. D, Mommer L, De Vries F. T. Going underground: Root traits as drivers of ecosystem processes. *Trends in Ecology and Evolution.* 2014; 29:692-699
- [108] Bargaz A, Lyamlouli K, Chtouki M, Zeroual Y, Dhiba D. Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. *Front Microbiol.* 2018; 9(1606):1-25
- [109] Barrueto J, Solano B. R, Lucas J. A, Lobo A. P, Garsia-Villaraco A, Manero F.L.G. *Plant-bacteria Interaction: Strategies and Techniques to Promote Plant Growth.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA. 2008; p. 1-17

- [110] Bartness J. E. Thermodynamics of the electron and the proton. J. Phys. Chem. 1994; 96:6420–6424
- [111] Barz W, Koster J, Weltring K. M, Strack D. Recent advances in the metabolism and degradation of phenolic compounds in plants and animals. Annu. Proc. Phytochem. Soc. Eur. 1985; 25:307-347
- [112] Basaga H. S. Biochemical aspects of free radicals. Biochemistry and Cell Biol. 1990; 68(4):989–998
- [113] Bashan Y, de-Bashan L. E. Fresh-Weight measurements of roots provide inaccurate estimates of the effects of plant growth-promoting bacteria on root growth: A critical examination. Soil Biol. Biochem. 2005; 37:1795–1804
- [114] Basu S, Ramegowda V, Kumar A, Pereira A. Plant adaptation to drought stress. F1000 Faculty Rev. 2016; 5(1554):1-10
- [115] Bedasa M. Selection of barley varieties for their yield potential at low rain fall area based on both quantitative and qualitative characters northwest tigray, Shire, Ethiopia. International Journal of Plant Breeding and Genetics. 2014; 8:205-213
- [116] Beed F. D, Paveley N. D, Sylvester-Bradley R. Predictability of wheat growth and yield in light limited conditions. J. Agr. Sci. 2007; 145:63–79
- [117] Belal H, Moushumi A. Growth and yield of barley (*Hordeum vulgare* L.) as affected by irrigation, sowing method and phosphorus level. Academia Journal of Agricultural Research. 2014; p.031
- [118] Berhow M. A, Wagner E. D, Vaughn S. F, Plewa M. J. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. Mutat Res-Fund Mol. 2000; 448(1):11-22
- [119] Bezerra G, Pereira M, Ostrosky E, Barbosa E, Moura M, Ferrari M, Aragoa C, Gomes A. Compatibility study between ferulic acid and excipients used in cosmetic formulations by TG/DTG, DSC and FTIR. Therm. Anal. Calorim. 2017; 127:1683-1691

- [120] Biljana K, Djendji V. Flavonoids and phenolic acids as potential natural antioxidants. *Antioxidants* Emad Shalaby, IntechOpen. 2019; DOI: 10.5772/intechopen.83731
- [121] Biswas J. C, Ladha J. K, Dazzo F. B, Yanni Y. G, Rolf B. G. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. *Agron J.* 2000; 90:880–886
- [122] Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *LWT-Food Sci. Technol.* 1997; 30(6):609–615
- [123] Byong H. L. Fundamentals of food biotechnology. VCH Publishers. 1996; p.191
- [124] Cattivelli L, Rizza F, Badeck F. W, Mazzucotelli E, Mastrangelo A. M, Francia E, et al. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Res.* 2008; 105:1–14
- [125] Cecile M, Mona S, Nils S, Martin M. Prospects of pan-genomics in barley. *Theoretical and Applied Genetics.* 2018; p.1-13
- [126] Chandrasekaran M, Chun S. C, Oh J. W, Paramasivan M, Saini R. K, Sahayarayan J. J. *Bacillus subtilis* CBR05 for Tomato (*Solanum lycopersicum*) Fruits in South Korea as a Novel Plant Probiotic Bacterium (PPB): Implications from Total Phenolics, Flavonoids, and Carotenoids Content for Fruit Quality. *Agronomy.* 2019; 9(838):1-11
- [127] Chauhan D. S, Deswal D. P, Dahiya O. S, Punia R. C. Change in storage enzymes activities in natural and accelerated aged seed of wheat (*Triticum aestivum*). *Indian J. Agri. Sci.* 2011; 81(11):1037–1040
- [128] Chavan U. D. Phenolic: Antioxidants and health benefits. Natural sources of phenolic antioxidants. 2018; p.218

- [129] Chen J, Yang J, Ma L. et al. Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Sci Rep.* 2020; 10(2611):1-9
- [130] Chen W. J, Song J. R, Guo P, Wen Z. Y. Butein, a more effective antioxidant than α -tocopherol. *Journal of Molecular Structure: TEOCHEM.* 2006; 763:161–164
- [131] Chen Y, Xiao H, Zheng J, Liang G. Structure-thermodynamics-antioxidant activity relationships of selected natural phenolic acids and derivatives: an experimental and theoretical evaluation. *Plos one.* 2015; 10(3):1–20
- [132] Christopher S. C. The subfamilies and tribes of gramineae (Poaceae) in the Southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum.* 1985; 66(2):123-199
- [133] Cinzia F, Facchiano F, Bartoli M, et al. Beneficial role of phytochemicals on oxidative stress and age-related diseases. *Biomed Research International.* 2019; p. 1-16
- [134] Colin W, Harold C, Koushik S, Jon F. Encyclopedia of food grains. Grain and plant morphology of cereals and how characters can be used to identify varieties. 2015; 1:62
- [135] Conn V. M, Walker A. R, Franco C. M. M. Endophytic Actinobacteria Induce Defense Pathways in *Arabidopsis thaliana* II *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2008; 21: 208-218
- [136] Conner P. J. Effects of stratification, germination temperature and pre-treatment with gibberellic acid and hydrogen peroxide on germination of ‘Fry’ muscadine (*Vitis rotundifolia*) seed. *Hort. Sci.* 2008; 43(3):853-856
- [137] Cornish A. S, Page W. J. The catecholate siderophores of *Azotobacter vinelandii*: their affinity for iron and role in oxygen stress management. *Microbiology.* 1998; 144:1747–1754
- [138] Costerton J. W. Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 1995; 15:137–140

- [139] Dabral S, Saxena S.C, Choudhary D.K. et al. Synergistic inoculation of *Azotobacter vinelandii* and *Serendipita indica* augmented rice growth. *Symbiosis*. 2020; 10.1007/s13199-020-00689-6
- [140] Dahlin I, Kiaer L. P, Bergkvist G. et al. Plasticity of barley in response to plant neighbors in cultivar mixtures. *Plant Soil*. 2020; 447:537–551
- [141] Dai J, Mumper R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010; 15(10):7313-7352
- [142] Dai Q, Zhao Y, Dong F, Wang B, Huang Y. Interaction between bentonite and *Bacillus litoralis* strain SWU9. *Applied Clay Science*. 2014; 100:88–94
- [143] Daiva J, Ona A, Gabriele P. Photosynthetic responses of spring barley varieties to different stand densities under field conditions. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 2012; 62(5):441-448
- [144] Daniel O. C, Andreia F. C, Luis F. G. Determination of phenolic content in different barley varieties and corresponding malts by liquid chromatography-diode array Detection-Electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Antioxidants*. 2015; 4:563-576
- [145] Daniel M. D, Timothy B. S, Keith W, Mark W. R, Sarah K. L, Alejandro Nin-P, Dirk W, Sherman R, Tingju Z, Nicola C, Shahnila D, Richard D. R. Agricultural investments and hunger in Africa modeling potential contributions to SDG2 – Zero Hunger. *World Development*. 2019; 116:38–53
- [146] Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci*. 2000; 57:779–795
- [147] Dat J. F, Pellinen R, Beeckman T, Kangasjärvi J, Langebartels C, Inze D, Van Breusegem F. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant*. 2003; 33:621–632
- [148] David M. P, Patrícia V, Jose A. P, Paula B. A. Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*. 2009; 14: 2202-2211

- [149] Davide F, Alessandro R, Roberto C. *Fusarium* toxins in cereals: Occurrence, Legislation, Factors promoting the appearance and their management. *Molecules*. 2016; 21(627):1-35
- [150] De Vleesschauwer D, Djavaheiri M, Bakker P.A.H.M, Hofte M. *Pseudomonas fluorescens* WC S374r-1 induced Systemic Resistance in Rice against *Magnaporthe oryzae* Is Based on Pseudobactin-Mediated Priming for a Salicylic Acid-Repressible Multifaceted Defense Response. *Plant Physiology*. 2008; 148:1996-2012
- [151] Deng Xi-Ping, Yu-Jie Ch, Xiao-Bing Wu, Sang-Soo K, Wei Ch, Eneji A. E. Exogenous hydrogen peroxide positively influences root growth and metabolism in leaves of sweet potato seedlings. *AJCS*. 2012; 6(11):1572-1578
- [152] Dinis T. C, Maderia V. M, Almeida L. M. Action of phenolic derivatives (Acetaminophen, Salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys*. 1994; 15(315):161-9
- [153] Dragan A, Stepanic V, Lucic B, Markovic Z, Markovic J. M. D. PM6 study of free radical scavenging mechanisms of flavonoids: why does O-H bond dissociation enthalpy effectively represent free radical scavenging activity? *J. Mol. Model*. 2013; 19:2593–2603
- [154] Duval J. R, Nesmith D. S. Treatment with hydrogen peroxide and seedcoat removal or clipping improve germination of “Genesis” triploid watermelon. *HortScience*. 2000; 35:85-86
- [155] Egamberdieva D, Wirth S. J, Alqarawi A. A, Abd Allah E. F, Hashem A. Phytohormones and Beneficial Microbes: Essential Components for Plants to Balance Stress and Fitness. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8:1–21
- [156] Eliseu R, Naira P, Ismael I. R, Luciano V. G, Camila R. M, Roseane F. Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil. *Food Science and Technology*. 2011; 31(4):911-917

- [157] Fahad S, Bajwa A. A, Nazir U, et al. Crop production under drought and heat stress: Plant responses and management options. *Front Plant Sci.* 2017; 8(1147):1-16
- [158] Folin O, Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry.* 1927; 73:627–650
- [159] Food and Agricultural Organization for the United Nations: STAT. 2019
- [160] Foyer C. H, Trebst A, Noctor G. Protective and signaling functions of ascorbate, glutathione and tocopherol in chloroplasts. *Advances in Photosynthesis and Respiration: Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment.* 2005; 19:241–268
- [161] Frisch M. J, Trucks G. W, Schlegel H. B, et.al, Gaussian 09, Revision A.02. Gaussian Inc., Wallingford, CT 2009
- [162] Funk C. C, Brown M. E. Declining global per capita agricultural production and warming oceans threaten food security. *Food Sec.* 2009; 1:271–289
- [163] Gadd G. M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology.* 2010; 156(3):609-643
- [164] Geddes B. A, Ryu M-H, Mus F, Garcia Costas A, Peters J. W, Voigt C. A, Poole P. Use of plant colonizing bacteria as chassis for transfer of N₂-fixation to cereals. *Current Opinion in Biotechnology.* 2015; 32:216–222
- [165] Gorlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* 2015; 6:260-271
- [166] Goupy P, Dufour C, Loonis M, Dangles O. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH Radical. *Agric. Food Chem.* 2003; 51(3):615–622
- [167] Grains Research and Development Corporation. *Plant Growth and Physiology.* 2018; p.1-22
- [168] Grayston S. J, Wang S, Campbell C. D, Edwards A. C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 1998; 30(3):369–378

- [169] Hakan M. D, Evren C, Musa D. Mapping and analyzing the spatial distribution of the tribe Triticeae Dumort. (*Poaceae*) in Turkey. Turkish Journal of Botany. 2017; 41:37
- [170] Halfeld-Vieira B. A, Vieira J. R, Romeiro R. S, Silva H. S. A, Baracat-Pereira M. C. Induction of systemic resistance in tomato by autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. 2006; 41:1247–1252
- [171] Hameed Amjad, et al. Influence of exogenous application of hydrogen peroxide on root and seedling growth on wheat (*Triticum aestivum* L.). Agric. Biol. 2004; 6(2):366-369
- [172] Hector V, Jody S. Green Manure Crops: Barley. College of Tropical Agriculture and Human Resources (CTAHR). 2002; p.1
- [173] Hensel G, Kastner C, Oleszczuk S, Riechen J, Kumlehn J. Agrobacterium-mediated gene transfer to cereal crop plants: current protocols for barley, wheat, triticale, and maize. International journal of plant genomics. 2009; 2009:835608
- [174] Hilal B. A, Yeriz S, Gamze A, Nilufer A. T. Pseudo-Cereals: Buckwheat and Quinoa. International Congress on Medicinal and Aromatic Plants. 2017; p.1002
- [175] Howell C. R. Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Diseases. 2003; 87:4–10
- [176] Hu N, Zhao B. Key genes involved in heavy-metal resistance in *Pseudomonas putida* CD2. FEMS Microbiol. Lett. 2007; 267:17–22
- [177] Huang M. H, Zhang S. Q, Di G. L, Xu L. K, Zhao T. X, Pan H. Y, Li Y. G. Determination of a *Bacillus velezensis* strain for controlling soybean root. Biocontrol Science and Technology. 2017; 27(5):696-701
- [178] Huarte R, Garcia M.D. *Tripsacum dactyloides* L. (*Poaceae*) caryopsis dormancy and germination responses to scarification, hydrogen peroxide and phytohormones. Seed Sci. Technol. 2009; 37:544-553

- [179] Ighodaro O. M, Akinoye O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *AJM*. 2018; 54(4):287-293
- [180] Ilic S. B, Konstantinovic S. S, Todorovic Z. B, Lazic M. L, Veljkovic V. B, Jokovic N, Radovanovic B. C. Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycete isolates. *Microbiology*. 2007; 76:421–428
- [181] Iryna Skorochood, Alla Roy, Ivan Kurdish, Ulziijargal Erdenetsogt. Content of organic acids in the cultural medium of *Bacillus subtilis* IMV B-7023 at cultivation with different sources of the phosphorus nutrient. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2020; 10(1):73-77
- [182] Ivan Kurdish, Alla Roy, Iryna Skorochood, Andrii Chobotarov, Iryna Herasimenko, Vadim Plotnikov, Valentina Gylchuk, Alexander Korniychuk. Free-flowing complex bacterial preparation for crop and efficiency of its use in agroecosystems. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2019; 4(6):527-531
- [183] Jacoby R, Peukert M, Succurro A, Koprivova A, Kopriva S. The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition-Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*. 2017; 8:1–16
- [184] Jenny E. Barley starch, structure and properties. *Agronomy Program Food Science*. 2012; p.8
- [185] Jeremic S, Amic A, Stanojevic-Pirkovic M, Markovic Z. Selected anthraquinones as potential free radical scavengers and P-glycoprotein inhibitors. *Org. Biomol. Chem*. 2018; 16:1890-1902
- [186] Jonathan P. A, Prince A. Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicology Reports*. 2015; 2:721-728
- [187] Jones D. L, Rowe E. C. Land reclamation and remediation, principles and practice. *Encyclopedia of applied plant sciences*. 2003; 2:741-748

- [188] Jordan H. R, Tomberlin J. K. Abiotic and biotic factors regulating inter-kingdom engagement between insects and microbe activity on vertebrate remains. *Insects*. 2017; 8(2):54
- [189] Joseph H. Topics in Brewing: Malting Barley. Master Brewers Association of the Americas. 2013; 50(1):29-30
- [190] Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen J, Mullineaux P. C. Systemic signaling and acclimatation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science*. 1999; 284:654–657
- [191] Kasote D. M, Katyare S. S, Hegde M. V, Bae H. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International journal of biological sciences*. 2015; 11(8):982
- [192] Katarzyna T, Renata T, Marcin K, Edward R, Jolanta J, Krystyna S. Antifungal Properties of *Fucus vesiculosus* L. Supercritical Fluid Extract Against *Fusarium culmorum* and *Fusarium oxysporum*. *Molecules*. 2019; 24(3518):1-16
- [193] Kedare S. B, Singh R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Food Sci Technol*. 2011; 48(4):412-422
- [194] Khalid A, Arshad M, Zahir Z. A. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*. 2004; 96(3):473–480
- [195] Khan M. I, Fatma M, Per T. S, Anjum N. A, Khan N. A. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front Plant Sci*. 2015; 6(462):1-17
- [196] Khan M. I, Shin J. H, Kim J. D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb Cell Fact*. 2018; 17(1):36
- [197] Klein E, Rimarcik J, Lukes V. DFT/B3LYP study of the O-H bond dissociation enthalpies and proton affinities of para-and meta-substituted phenols in water and benzene. *Acta Chim. Slovaca*. 2009; 2(2):37–51

- [198] Klein J. D, Wood L. A, Geneve R. L. Hydrogen peroxide and color sorting improves germination and vigor of eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloides*) seeds. *Acta Hortic.* 2008; 782:93-97
- [199] Kloepper J. W, Schroth M. N. Plant growth promoting rhizobacteria on radish. *Proceedings of the 4th Conference plant pathogenic bacteria.* Angers, INRA. 1978; p. 879–882
- [200] Korzeniowska K, Boguslawa Gorka, Jacek Lipok, Piotr Wieczorok. Algae biomass characteristics and applications: Phenolic compounds. *Developments in applied phycology* 2018; 8:80
- [201] Kosova K, Chrpova J, Sip V. Recent advances in breeding of cereals for resistance to barley yellow Dwarf virus - a review. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2008; 44:1–10
- [202] Kosova K, Prasil I. T, Vitamvas P. The relationship between vernalization and photoperiodically regulated genes and the development of frost tolerance in wheat and barley. *Biol. Plant.* 2008; 52:601–615
- [203] Kosova K, Vitamvas P, Prasil I. T. Proteomics of stress responses in wheat and barley-search for potential protein markers of stress tolerance. *Front Plant Sci.* 2014; 5:711
- [204] Kozar S. F, Zhrebtor T. A, Demchuk I. V. Efficiency of the potato inoculation with *Azotobacter* as effected by potato lectin. *Agricultural Microbiology: Interag. Them. Res. Miscel.* 2009; 9:95–103
- [205] Kumar A, Prakash A, Johri B. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. *Bacteria in agrobiolgy: crop ecosystems.* Springer. 2011; p. 37-59
- [206] Kumar M. S, Maneemegalai S. Evaluation of larvicidal effect of *Lantana camara* Linn against mosquito species *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Adv. Biol. Res.* 2008; 2:39–43
- [207] Kurdish I. K. Impact of a number of factors on physiological and biochemical activity of strains – components of Azogran, a complex bacterial preparation. *Microbiology.* 2016; 78(6):28–35

- [208] Kurutas E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative / nitrosative stress: current state. *Nutrition*. 2016; 15(1):71
- [209] Kyrychenko O. V. Market analysis and microbial biopreparations creation for crop production in Ukraine. *Biotechnologia Acta*. 2015; 8(4):40-52
- [210] Lamaoui M, Jemo M, Datla R, Bekkaoui F. Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Front Chem*. 2018; 6(26):1-14
- [211] Lars M. G. Historical brewing techniques: Barley varieties. 2020; p.49
- [212] Laurie V. F. Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications. Management in different industry sectors. 2010; 2:445-475
- [213] Lee C, Yang R. G, Parr W. Development of the Cole-Salveti correlation energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review*. 1988; 37(2):785–789
- [214] Lee C. Y, Sharma A, Semenya J, Anamoah C, Chapman K. N, Barone V. Computational study of Ortho-Substituent effects on antioxidant activities of phenolic dendritic antioxidants. *Antioxidants (Basel)*. 2020; 9(3):189
- [215] Lim K. T, Shukor M. Y, Wasoh H. Physical, chemical, and biological methods for the removal of arsenic compounds. *BioMed research international*. 2014; 2014:1-9
- [216] Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*. 2010; 4(8):118-126
- [217] Lucie P, Kristyna K, David B, Vladimir K, Katerina V. Simple and rapid HPLC separation and quantification of flavonoid, flavonolignans, and 2, 3-dehydro flavonolignans in silymarin. *Foods*. 2020; 9(116):1-13
- [218] Luo Y. R. Handbook of Bond Dissociation Energies in Organic Compounds. Florida: CRC Press: Boca Raton. 2003; p. 380
- [219] Markovic Z, Milenkovic D, Dorovic J, Dimitric Markovic J. M, Stepanic V, Lucic B, Amic D. PM6 and DFT study of free radical scavenging activity of morin. *Food Chem*. 2012; 134:1754–1760

- [220] Markovic Z. Study of the mechanisms of antioxidative action of different antioxidants. *Journal of the Serbian Society for Computational Mechanics*. 2016; 10(1):135-150
- [221] Markovska Y. K, Gorinova N. I, Nedkovska M. P, Miteva K. M. Cadmium-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Brassica juncea* plants. *Biol Plant*. 2009; 53(1):151–154
- [222] Mary O, Feng Li, Guiju Sun, Qiuhui Hu. Antioxidant effect of roasted barley (*Hordeum vulgare* L.) grain extract towards oxidative stress in vitro and in vivo. *Food and Nutrition Sciences*. 2013; 4:139-146
- [223] Masella R, Vari R, d'Archivio M, di Benedetto R, Matarrese P, Malorni W, Scazzocchio B, Giovannini C. Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *J Nutr*. 2004; 134:785–791
- [224] Masipa T. S. The impact of climate change on food security in South Africa: Current realities and challenges ahead. *Jamba*. 2017; 9(1):411
- [225] Massalha H, Korenblum E, Tholl D, Aharoni A. Small molecules belowground: the role of specialized metabolites in the rhizosphere. *The Plant Journal*. 2017; 90:788–807
- [226] Meili H, Trust B. Qualitative and quantitative analysis of the major phenolic compounds as antioxidants in barley and flaxseed hulls using HPLC/MS/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2012; 92(10):2062
- [227] Meysam N. On the antioxidant activity of the *Ortho* and *Meta* Substituted Daidzein Derivatives in the gas phase and solvent environment. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 2014; 58(1):36-45
- [228] Michaela H, Zuzana P, Alena B, Frantisek G, Andrea H, Ernest S. Cereal β -glucans and their significance for the preparation of functional foods: A Review. *Food Science*. 2011; p.1–14
- [229] Mikulski D, Eder K, Molski M. Quantum-Chemical study on relationship between structure and antioxidant properties of hepatoprotective compounds

- occurring in *Cynara Scolymus* and *Silybum Marianum*. Journal of Theoretical and Computational Chemistry. 2014; 13(1):1–24
- [230] Mikulski D, Gorniak R, Molski M. A theoretical study of the structure-radical scavenging activity of trans-resveratrol analogues and cis-resveratrol in gas phase and water environment. J. Med. Chem. 2010; 45(3):1015–1027
- [231] Milena M. V, Verena S. L, Mario R. M. Bioactive compounds. Phenolic compounds: structure, classification, and antioxidant power. 2019; 2:40
- [232] Mohannad G. Al. Taxonomy and phylogeny in *Triticeae*: A Historical Review and Current Status. Advances in Plants and Agriculture Research. 2016; 3(5):00108
- [233] Moldovan M, Lahmar A, Bogdan C, Parauan S, Tomuta I, Crisan M. Formulation and evaluation of a water-in-oil cream containing herbal active ingredients and ferulic acid. Clujul Med. 2017; 90:212–219
- [234] Morgan J. A, Bending G. D. White P. J. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. Journal Experimental Botany. 2005; 56: 1729–1739
- [235] Mosttafiz S, Rahman M. Biotechnology: Role of microbes in sustainable agriculture and environmental health. The internet journal of microbiology. 2012; 10(1):1-6
- [236] Muller M. E, Steier I, Köppen R, et al. Cocultivation of phytopathogenic *Fusarium* and *Alternaria* strains affects fungal growth and mycotoxin production. Appl Microbiol. 2012; 113(4):874-887
- [237] Munns R. Genes and salt tolerance: bringing them together. New Phytol. 2005; 167:645–663
- [238] Nautiyal C. S, Srivastava S, Chauhan P. S, Seem K, Mishra A, Sopory S. K. Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. Plant Physiol. Biochem. 2013; 66:1–9

- [239] Neerja S. Wheat production in changing environments. Molecular and biotechnological tools in developing abiotic stress tolerance in wheat. 2019; p.284
- [240] Neil F, Phil B, Tim M, Nathan B. Barley growth and development. Industry and Investment. 2010; p.1-82
- [241] Nenadis N, Wang L-F, Tsimidou M. Z, Zhang H. Y. Radical scavenging potential of phenolic compounds encountered in O. Europaea products as indicated by calculation of bond dissociation enthalpy and ionization potential values. J Agric Food Chem. 2005; 53:295–299
- [242] Nia Lijuan, Liao Weibiao. Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. Frontiers in Plant Science. 2016; 7(230):1-14
- [243] Nick P. Foundation for arable research focus. Cereal Growth Stages. 2009; 2:1-44
- [244] Nicky J. A, Peter E. U. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field, Journal of Experimental Botany. 2012; 63(10):3523–3543
- [245] Ogawa K, Iwabuchi M. A mechanism for promoting the germination of Zinnia elegans seeds by hydrogen peroxide. Plant Cell Physiol. 2001; 42(3):286-291
- [246] Okamura Y. Competitive adsorption of phenolic acids on allophanic, halloysitic, and illitic clays. Clay Sci. 1990; 8:37–44
- [247] Olanrewaju O. S, Glick B. R, Babalola O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2017; 33(11):197–204
- [248] Ongena M, Jacques P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology. 2008; 16:115-125
- [249] Ortiz-Castro R, Contreras-Cornejo H. A, Macias-Rodriguez L, Lopez-Bucio J. The role of microbial signals in plant growth and development. Plant Signaling and Behavior. 2009; 4(8):701–712

- [250] Osmar R. D, Ramona F. H, Gergina L. M, Pedro R. J, Carlos R. S. *Azospirillum sp.* Inoculation in Wheat, Barley and Oats Seeds Greenhouse Experiments. Brazilian archives of biology and technology. 2004; 47(6):843-850
- [251] Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. J. Nutr. 1986; 44:307–315
- [252] Perez-Gonzales A, Galano A. OH radical scavenging activity of Edaravone: mechanism of kinetics. Phys. Chem. B. 2011; 115(5):1306–1314
- [253] Pham-Huy L. A, Hua H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. International journal of biomedical science. 2008; 4(2):89
- [254] Phillip B, Jan E, Nathan F, Tumut T. M, Nyngan B. M, Gunnedah K. R, Parkes A. S, Hay K. S, Coonabarabran J. W. Procrop Wheat Growth and Development. 2007; p.1-104
- [255] Pieterse C.M.J, Van der Ent S, Van Pelt J.A, Van Loon L.C. Advances in plant ethylene research: Proc. On Plant Hormone Ethylene. Springer. 2007; p. 325-331
- [256] Pisoschi A. M, Aneta P, Cimpeanu C, Predoi G. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. Oxidative medicine and cellular longevity. 2016; p.1-36
- [257] Podile A. R, Kishore G. K. Plant growth-promoting rhizobacteria. Plant-associated bacteria: Springer. 2007; p. 195-230
- [258] Qiao J, Yu X, Liang X, Liu Y, Borriss R, Liu Y. Addition of plant-growth-promoting *Bacillus subtilis* PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome. BMC Microbiol. 2017; 17(1):131
- [259] Quan J, Yin X, Jin M, Shen M. Study on the inhibition of alpha-glucosidase by soyasaponins. ZhongYaoCai-Journal of Chinese medical materials. 2003; 26(9):654-656

- [260] Raaijmakers J. M, Mazzola M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 2012; 50:403-424
- [261] Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*. 2007; 2(2):219
- [262] Rampitsch C, Bykova N. V, McCallum B, Beimcik E, Ens W. Analysis of the wheat and *Puccinia triticina* (leaf rust) proteomes during a susceptible host-pathogen interaction. *Proteomics*. 2006; 6:1897–1907
- [263] Rathore P. Isolation, Biochemical Characterization and inoculation effect of *Azospirillum* on the growth of wheat. *International Journal of Science and Research*. 2014; 3(6):626–628
- [264] Redza-Dutordoir M, Averill-Bates D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2016; 1863(12):2977-2992
- [265] Rejeb I. B, Pastor V, Mauch-Mani B. Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. *Plants*. 2014; 3(4):458-475
- [266] Rocheli de Souza, Adriana Ambrosini, Luciane M.P. Passaglia. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*. 2015; 38(4):401-419
- [267] Rosenblueth M, Martinez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant–Microbe Interact*. 2006; 19:827–837
- [268] Rosier A, Medeiros F. H, Bais H. P. Defining plant growth promoting rhizobacteria molecular and biochemical networks in beneficial plant-microbe interactions. *Plant Soil*. 2018; 428:35–55
- [269] Roxana S. Barley. Crop yield response to water. 2012; p.134
- [270] Ruiz J. M, Rivero R. M, Lopez-Cantarero I, Romero L. Role of Ca²⁺ in the metabolism of phenolic compounds in tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L). *Plant Growth Regulation*. 2003; 41:173–177

- [271] Sakshi T, Naveen K. A. Plant growth promoting rhizobacteria for ameliorating abiotic stresses triggered due to climatic variability. *Climate Change and Environmental Sustainability*. 2013; 1(2):1-9
- [272] Samuel P. K, Diah I. W, Patrick T, Reinaldo K, Christina D. A, Miranti V. Extraction of Coffee Silver skin and the Development of Antioxidant-Rich Products. *International Conference on Food, Agriculture and Biotechnology*. 2018; p.117-131
- [273] Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Orozco-Mosqueda M. C, Glick B.R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*. 2016; 183:92–99
- [274] Sarvash O, Bati V, Markush N, Levchuk O, Melnyk V, Mizernytskyy O, Boyko N. Novel antimicrobials of complex origin. *XIII Congress of the Society of Microbiologists of Ukraine named after. S.M. Vynohradsky*. 2013; 13(4):220
- [275] Saunders M, Kohn L. M. Evidence for alteration of fungal endophyte community assembly by host defense compounds. *New Phytol*. 2009; 182:229-238
- [276] Schanne F. A. X, Kane A. B, Young E. A, Farber J. L. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*. 1979; 206:700–702
- [277] Sebanek J, et al. Developments in crop science. *Plant integrity in the sphere of vegetative organs*. 2012; p.274
- [278] Sebastian S, Sundaraganesan N, Manoharan S. Molecular structure, spectroscopic studies and first-order molecular hyperpolarizabilities of ferulic acid by density functional study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009; 74:312–323
- [279] Serna S. *Encyclopedia of food and health*. Cereals: Dietary Importance. 2016; 2:703
- [280] Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Agriculture. Food Chemistry*. 1992; 40:945–948

- [281] Sigler K, Chaloupka J, Brozmanova J, Stadler N, Höfer M. Oxidative stress in microorganisms – I. Microbial vs. higher cells – damage and defenses in relation to cell aging and death. *Folia microbial.* 1999; 44(6):587-624
- [282] Sina M. A, Mohsen M. Advances in Fenton and Fenton Based Oxidation Processes for Industrial Effluent Contaminants Control-A Review. *Int J Environ Sci. Nat. Res.* 2017; 2(4):555594
- [283] Smirnoff N, Cumbes Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solute. *Phytochemistry.* 1989; 28(4):1057–1060
- [284] Souza R, Ambrosini A, Passaglia L. M. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet Mol Biol.* 2015; 38(4):401-419
- [285] Stewart A. J, Stewart R. F. Encyclopedia of ecology: Phenolic compound. Elsevier Science. 2008; p.3120
- [286] Stuper-Szablewska K, Kurasiak-Popowska D, Nawracala J, et al. Quantitative profile of phenolic acids and antioxidant activity of wheat grain exposed to stress. *Eur Food Res Technol.* 2019; 245:1595–1603
- [287] Sulkowska Z. K, Szewczyk A, Galanty A, Gdula-Argasinska J, Muszynska B. Chemical composition and biological activity of extracts from fruiting bodies and mycelial cultures of *Fomitopsis betulina*. *Molecular Biology Reports.* 2018; 45(6):2535-2544
- [288] Svend J. K. Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure.* Elsevier Science. 2003; 5:387-392
- [289] Takara K, Otsuka K, Wada K, Iwasaki H, Yamashita M. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity and tyrosinase inhibitory effects of constituents of sugarcane molasses. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007; 71(1):183-191
- [290] Tamer H. G, El-Sayed M, Abdel-Aal. Phenolic acids and antioxidant properties of barley wholegrain and pearling fractions. *Agricultural and Food Science.* 2012; 21:118-119

- [291] Tayyebbeh M, Mohammad R. O, Behrooz J, Masoomah B, Mannan H, Naficeh S. Antioxidant activity of Iranian barley grain cultivars and their malts. *African Journal of Food Science*. 2015; 9(11):534-539
- [292] Tejeda L, De Biec M, Nilsson L, Penarrieta J. M, Alvarado J. A. Chemical composition, antioxidant capacity and content of phenolic compounds in meals collected in hospitals in Bolivia and Sweden. *Nutr Hosp*. 2012; 27(4):1009-1016
- [293] Teoh Yi Peng, Mashitah Mat Don, Salmiah Ujang. Media selection for mycelia growth, antifungal activity against wood-degrading fungi, and GC-MS study by *Pycnoporus sanguineus*. *Bio Resources*. 2011; 6(3):2719-2731
- [294] Thomashow M. F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Plant Phys*. 1999; 50:571–599
- [295] Thondre P, Ryan L, Henry C. Barley b-glucan extracts as rich sources of polyphenols and antioxidants. *Food Chem*. 2011; 126:72-77
- [296] Timmusk S, Wagner E. G. H. The plant growth promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Plant-Microb Interactions*. 1999; 1(2):951–959
- [297] Trouillas P, Marsal P, Siri D, Lazzaroni R, Duroux J-L. A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: the specificity of the 3-OH site. *Food Chem*. 2006; 97:679–688
- [298] Ukrainian Patent №106135C2. The method of the reception of free-flowing complex bacterial preparation for crop production. 2014; № 14
- [299] Ullrich S. E. Barley: Barley Breeding History, Progress, Objectives, and Technology. *Production, Improvement and Uses*. 2011; p.158
- [300] Ulziijargal E, Gorgo Yu. P, Tuvshinjargal G. Screening of fungi from wheat seeds. *International Conference on Public health issues and perspectives dedicated to the 85th anniversary of establishment of the National center for public health of Mongolia*. 2018; p.100-101

- [301] Ulziijargal E, Skorocho I. O, Kurdish I. K, Gorgo Yu. P. The role of phenolic compounds in the formation of barley antioxidant potential. The All-Ukrainian Scientific-Practical conference "Biotechnology of the XXI Century" is dedicated to the 185th anniversary of the birth of Dmitry Ivanovich Mendeleev. 2019; p. 66
- [302] Ulziijargal E, Skorocho I. O, Kurdish I. K, Gorgo Yu. P. Genetic mapping of barley genes. The All-Ukrainian Scientific-Practical conference "Biotechnology of the XXI Century" is dedicated to the 185th anniversary of the birth of Dmitry Ivanovich Mendeleev. 2019; p. 67
- [303] Ulziijargal Erdenetsogt, Yu. P. Gorgo, I. O. Skorocho. Detection of Seedborne Mycoflora in Wheat. International Journal of Innovative Science and Research Technology. 2019; 4(10):532-536
- [304] Ulziijargal E, Skorocho I. O, Kurdish I. K, Gorgo Yu. P. Barley production and consumption. Cuiavian University in Wloclawek invites to participate in international scientific and practical conferences on medical, natural and technical sciences. Republic of Poland. 2019; p. 27-30
- [305] Ulziijargal E, Skorocho I. O, Kurdish I. K, Roy A. A, Gorgo Yu. P. Antioxidant action of a nanocomposite biological product Azogran on seeds development of different varieties of barley. International journal of Scientific and Research Publications. 2020; 10(4):154-158
- [306] Ulziijargal E, Skorocho I. O, Kurdish I. K, Gorgo Yu. P. Bacterial preparation for agricultural use. XIV-International Scientific and Practical Conference "Biotechnology of the XXI Century" dedicated to the 135th anniversary of the birth of Alexander Vladimirovich Palladin. 2020; c. 86
- [307] Urbaniak A, Molski M, Szelag M. Quantum-chemical calculations of the antioxidant properties of *trans-p*-coumaric acid and *trans*-sinapinic acid. Computational Methods in Science and Technology. 2012; 18(2):1–112
- [308] US Department of Agriculture. ADM Germany Statistics. 2019
- [309] Van der Lelie D, Taghavi S, Monchy S, Schwender J, Miller L, Ferrieri R, Rogers A, Wu X, Zhu W, Weyens N, Vangronsveld J, Newman L. Poplar

- and its Bacterial Endophytes: Coexistence and Harmony. Crit. Rev. in Plant Sci. 2009; 26:346-358
- [310] Van Loon L, Bakker P, Pieterse C. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu Rev. Phytopathol. 1998; 36:453–483
- [311] Van Loon L. C. Plant responses to plant growth promoting rhizobacteria. Eur. J. Plant Pathol. 2007; 119:243–254
- [312] Van Oosten M. J, Di Stasio E, Cirillo V, et al. Root inoculation with *Azotobacter chroococcum* 76A enhances tomato plants adaptation to salt stress under low N conditions. BMC Plant Biol. 2018; 18(1):205
- [313] Vanessa Z. L, Wesley C. R, Marcelo A, Natalia D. A, Nidia R. C. Inoculation of diazotrophic bacteria and nitrogen fertilization in topdressing in irrigated corn. Rev. Caatinga, Mossoro. 2016; 29(2):338–347
- [314] Vardharajula S, Ali S. Z, Grover M, Reddy G, Bandi V. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus spp*: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. Journal of Plant Interactions. 2011; 6(1):1–14
- [315] Velasquez A. C, Castroverde C. D, He S. Y. Plant-Pathogen Warfare under Changing Climate Conditions. Curr Biol. 2018; 28(10):619-634
- [316] Verbon E. H, Liberman L. M. Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. Trends in Plant Science. 2016; 21:218-229
- [317] Wafaa M. H, Abouziena H. F, Abd-El-Kreem F, El Habbasha S. Agriculture biotechnology for management of multiple biotic and abiotic environmental stress in crops. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2015; 7(10):882-889
- [318] Wahid A, Sehar S, Perveen M, Galani S et al. Seed pretreatment with hydrogen peroxide improves heat tolerance in maize at germination and seedling growth stages. Seed Sci Technol. 2008; 36:633–645
- [319] Waly A, El-Karamany M. F, Shaaban A. M, Bakry A. B, Elewa T. A. Utilization of hydrogel for reducing water irrigation under sandy soil

- condition 2-Preliminary study: yield and yield components of rice and barley in sandy soil as affected by hydrogel. *Research Journal of Pharmaceutical: Biological and Chemical Sciences*. 2015; p.1018-1024
- [320] Wang M, Zheng Q, Shen Q, Guo S. The critical role of potassium in plant stress response. *Int J. Mol. Sci*. 2013; 14(4):7370-7390
- [321] Wang W, Wang A. Nanoscale Clay Minerals for Functional Ecomaterials: Fabrication, Applications, and Future Trends. In *Handbook of Ecomaterials*. 2019; p. 2409-2490
- [322] Wiegmann M, Maurer A, Pham A, et al. Barley yield formation under abiotic stress depends on the interplay between flowering time genes and environmental cues. *Sci Rep*. 2019; 9:6397
- [323] Wilfried S, Okkyung K. Ch, Dorian W, Seak-Ho P. Ullmann's food and feed. *Cereals*. 2017; 2:540
- [324] Wright J. S, Johnson E. R, DiLabio G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Chem. Soc*. 2001; 123(6):1173–1183
- [325] Yang J, Kloepper J. W, Ryu C. M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci*. 2009; 14:1–3
- [326] Yang S, Vanderbeld B, Wan J, Huang Y. Narrowing down the targets, towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops. *Mol. Plant*. 2010; 3:469-490
- [327] Yumiko Yoshiki, Jin-Hyeong K, Kazuyoshi Okubo. Saponins conjugated with 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one from *Phaseolus coccineus*. *Phytochemistry*. 1994; 36(4):1009-1012
- [328] Zadoks J. C, Chang T. T, Konzak C. F. A decimal code for the growth stages of cereals. *Wed. Res*. 1974; 14(6):415–421
- [329] Zaeema Kh, Hikmet B. A short overview on the latest updates on cereal crop plant genome sequencing with an emphasis on cereal crops and their wild relatives. *Journal of Crop Breeding and Genetics*. 2015; 1(2):2

- [330] Zeng P. Y, Wu J. G, Liao L. M. In vitro antioxidant activities of endophytic fungi isolated from the liverwort *Scapania verrucosa*. *Genetics and Molecular Research*. 2011; 10(4):3169–3179
- [331] Zeng Y, Pu X, Yang J, Du J, Yang X, Li X, Yang T. Preventive and therapeutic role of functional ingredients of barley grass for chronic diseases in human beings. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018; 3232080:1-13
- [332] Zhang X, Chen F, Wang M. Bioactive substances of animal origin. *Handbook of food chemistry*. 2015; p.1009-1033
- [333] Zhou M. X. Barley production and consumption. *Genetics and Improvement of Barley Malt Quality*. 2010; p.1-17
- [334] Zhu Y, Li Y, Lu A. H, Wang H. R, Yang X. X, Wang C. Q. Study of the interaction between bentonite and a strain of *Bacillus mucilaginosus*. *Clay Miner*. 2011. 59:538–545
- [335] Zorov D. B, Juhaszova M, Sollott S. J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014; 94(3):909-950
- [336] Yu X, Zhao M, Liu F, Zeng S, Hu J. Identification of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one as a strong antioxidant in glucose–histidine Maillard reaction products. *Food Res Int*. 2013; 51:397-403

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України та виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних

1. Iryna Skorochod, Alla Roy, Ivan Kurdish, **Ulziijargal Erdenetsogt**. Content of organic acids in the cultural medium of *Bacillus subtilis* IMV B-7023 at cultivation with different sources of the phosphorus nutrient // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2020; №.10(1), p.73-77. ISSN: 1338:5178. *Особистий внесок здобувача – проведення високоефективної рідинної хроматографії фенолкарбонових кислот в метанольних екстрактах різних сортів ячменю, підготовка статті до друку.*
2. **E. Ulziijargal**, I.O. Skorochod, I.K. Kurdish, A.A. Roy, Yu.P. Gorgo. Antioxidant action of a nanocomposite biological product Azogran on seeds development of different varieties of barley // International Journal of Scientific and Research Publications. 2020; №.10(4), p.154-158. ISSN: 2250:3153. *Особистий внесок здобувача – визначення антиоксидантних властивостей препаратів для обробки паростків ячменю, статистична обробка даних, написання та оформлення статті.*
3. Skorochod I.A, **Ulziijargal E.**, Kurdish I.K, Gorgo Yu.P. Influence of a nanocomposite biological product of Azogran on barley seeds exposed to oxidative stress // Scientific Light. 2020; №.1(36), p.10-14. ISSN: 1338:5178. *Особистий внесок здобувача – визначення змін проростання ячменю при оксидативному стресі, підготовка статті до друку.*
4. **Ulziijargal Erdenetsogt**, Yu.P. Gorgo, I.O. Skorochod. Detection of Seedborne Mycoflora in Wheat // International Journal of Innovative Science and Research Technology - IJISRT. 2019; №.4(10), p.532-536. ISSN: 2456:2165. *Особистий внесок здобувача – проведення*

експериментальних досліджень, статистична обробка даних, написання та оформлення статті.

Публікації, які вказують на апробацію матеріалів дисертації

5. **Ulziijargal E**, Gorgo Yu.P, Skorochod I.O, Kurdish I.K. Bacterial preparation for agricultural use // Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», Київ. 2020; с.86 *Особистий внесок здобувача – написання та оформлення тез і підготовка та проведення доповіді.*
6. **Улзійжаргал Ерденецогт**, Скороход І.О, Курдиш І.К, Горго Ю.П. Антиоксидантна дія біопрепарата Азогран на насіння ячменю // Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», Київ. 2020; с.87 *Особистий внесок здобувача – написання та оформлення тез і підготовка та проведення доповіді.*
7. **Ulziijargal Erdenetsogt**, Skorochod I.O, Kurdish I.K, Gorgo Yu.P. Barley production and consumption // Natural Sciences: History, The present time, The future, EU experience–International Scientific and Practical Conference, Republic of Poland. 2019; p.27-30. *Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, написання, оформлення та проведення доповіді.*
8. **Ulziijargal Erdenetsogt**, Skorochod I.O, Kurdish I.K, Gorgo Yu.P. Genetic mapping of barley genes // Матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», Київ. 2019; с.78 *Особистий внесок здобувача – написання та оформлення тез і підготовка та проведення доповіді.*
9. **Ulziijargal Erdenetsogt**, Skorochod I.O, Kurdish I.K, Gorgo Yu.P. The role of phenolic compounds in the formation of barley antioxidant potential // Матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», Київ. 2019; с.79 *Особистий внесок*

здобувача – написання та оформлення тез і підготовка та проведення доповіді.

10. **Ulziijargal E.**, Gorgo Yu.P, Tuvshinjargal G. Screening of fungi from wheat seeds // International Conference on Problems and Prospects of Public Health, dedicated to the 85th anniversary of the establishment of the National Public Health Center of Mongolia, Ulaanbaatar. 2018; p.100-101 *Особистий внесок здобувача – написання та оформлення тез і підготовка та проведення доповіді.*
11. **Улзійжаргал Ерденецогт**, Горго Ю.П. Особливості роботи імунної системи лікарських рослин // Матеріали XIII Міжнародної конференції по прикладній біофізиці, біоніці та біокібернетиці. Київ. 2018; с.24 *Особистий внесок здобувача – написання та оформлення тез і підготовка та проведення доповіді.*

Публікації, що додатково відображають наукові результати дисертації

12. **E. Ulziijargal**, B. Ichinkhorloo, M. Gansmaa, Ts. Elbegzaya. Results of biological analysis of some antibiotics // Pharmaceutical Science Development Conference. Ulaanbaatar. 2018; P. 63.
13. **Ulziijargal E**, Oyunbileg J, Tumenjargal D, Enkhjargal B. Study of Salmonella cell lysis activity by bacteriophage // Международная молодежная научно-практическая конференция "Иркутск–УланБатор". 2016; С. 86.
14. **E. Ulziijargal**, Kh. Mandakhtsetsen, M. Gansmaa, B. Ichinkhorloo. The results of microbiological and biochemical analysis of rabies vaccine // IV scientific conference reference laboratories. Ulaanbaatar. 2016; P. 38–40.
15. **E. Ulziijargal**, B. Ichinkhorloo, M. Gansmaa, Ts. Elbegzaya. Results of biological analysis of some antibiotics // IV scientific conference reference laboratories. Ulaanbaatar. 2016; P. 65–67.

16. **Ulziijargal E**, Battsetseg Ch. Water pollution of Khuvsgul and Baikal lakes // One Health-International Conference. Ulaanbaatar. 2016; P. 67–68, 90–91.
17. **E. Ulziijargal**, I. Bolormaa, M. Lhamdegd. The microbiological analysis results of water samples // J. Erin. 2016; Vol.6, P. 22–25.
18. **E. Ulziijargal**, J. Oyunbileg, D. Tumenjargal. Study of *Salmonella* cell lysis activity by bacteriophage // J. Khureltogoot. 2016; P. 92–94.
19. G. Tuvshinjargal, D. Orkhonselenge, L. Altantuya, B. Sainchimeg, B. Enkhtuya, P. Suvd, B. Ichinkhorloo, C. Lkhavga, B. Shinebayar, **E. Ulziijargal**. Identification and determination of physical, chemical and biological characterization of stem cells // J. NCPH – research report. 2015; P. 196–202.
20. **E. Ulziijargal**, J. Oyunbileg, B. Sainchimeg, Ch. Battsetseg. Preparation of immunoglobulin from human placenta suitable for use against HCV // J. Khureltogoot. 2015; P. 214–217.